

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Strategien zur Subklassifizierung Guillain-Barré-artiger  
Polyneuropathien bei Hund und Katze

von Simone Ingrid Groß

aus Tübingen

München 2017

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Institut für Tierpathologie  
Klinische und vergleichende Neuropathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers  
Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg  
Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder  
Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

**Tag der Promotion:** 29.07.2017

Meiner Familie

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1</b>	<b>GBS des Menschen.....</b>	<b>3</b>
1.1	Bedeutung und Epidemiologie .....	3
1.2	GBS-Subtypen .....	3
1.2.1	AIDP .....	4
1.2.2	AMAN .....	5
1.3	Ätiopathogenese des GBS .....	6
1.3.1	Derzeitige Kenntnisse zur Immunbiologie des GBS.....	6
1.3.1.1	Theorien zur molekularen Mimikry .....	6
1.3.1.2	Beteiligte Immunzellen .....	7
1.3.1.3	GBS-assoziierte Autoantikörper .....	9
1.4	Diagnose des GBS.....	11
1.4.1	Klinische Präsentation und Differentialdiagnosen .....	12
1.4.2	Liquordiagnostik .....	12
1.4.3	Elektrophysiologische GBS-Subtypen.....	13
1.4.4	Nervenbiopsie und histopathologische GBS Subtypen.....	15
1.4.5	Serologische Tests.....	17
1.5	Allgemeines zur Therapie und Prognose des GBS .....	18
<b>2</b>	<b>Tiermodelle für das GBS .....</b>	<b>19</b>
2.1	Tiermodelle für die AIDP .....	20
2.1.1	EAN .....	20
2.1.2	Spontanes AIDP-Modell bei Hühnern: AvIDP .....	20

2.2	Tiermodelle für die AMAN .....	21
2.2.1	Paralyse und Polyneuropathie in Hühnern nach <i>C. jejuni</i> Infektion	21
2.2.1.1	Spontane Variante.....	21
2.2.1.2	Experimentell-induzierte Variante .....	22
2.2.2	AMAN-Modell in Kaninchen durch Sensibilisierung mit GM1 .....	22
<b>3</b>	<b>Kanine und feline Immunneuropathien .....</b>	<b>23</b>
3.1	Kanine Immunneuropathien .....	23
3.1.1	CHP .....	23
3.1.2	ACP .....	24
3.1.2.1	Immunbiologie .....	24
3.1.2.2	Histologie.....	25
3.1.2.3	Klinische Symptome .....	26
3.1.2.4	Diagnose .....	26
3.1.2.5	Therapie .....	27
3.2	Feline Immunneuropathien.....	28
3.2.1	Histologie.....	28
3.2.2	Klinische Symptome .....	29
3.2.3	Diagnose .....	29
3.2.4	Therapie .....	30
<b>III</b>	<b>TEILSTUDIE 1: IMMUN-MEDIIERTE POLYNEUROPATHIEN – SUBTYPISIERUNG .....</b>	<b>31</b>
<b>IV</b>	<b>TEILSTUDIE 2: ENTWICKLUNG EINES PROTOKOLLS FÜR DIE WHOLE-MOUNT-IMMUNHISTOCHEMIE VON NERVENFASERZUPFPRÄPARATIONEN.....</b>	<b>65</b>
<b>V</b>	<b>GEMEINSAME DISKUSSION DER STUDIEN ZU KANINEN UND FELINEN IMMUN-MEDIIERTEN POLYNEUROPATHIEN.....</b>	<b>105</b>

<b>1</b>	<b>Methodische Grundlagen für eine verbesserte morphologische IMPN-Diagnostik .....</b>	<b>105</b>
<b>2</b>	<b>Integrierte Klassifikation und Diagnose von IMPN .....</b>	<b>113</b>
<b>3</b>	<b>Vergleich der felines und kaninen IMPN Subtypen mit bestehenden GBS-Tiermodellen .....</b>	<b>119</b>
3.1	EAN – das klassische GBS-Tiermodell .....	120
3.2	AIDP- und AMAN-Tiermodelle in Hühnern .....	121
3.3	AMAN-Tiermodell in Kaninchen .....	121
3.4	CHP, ACP und kanine/feline IMPN – neue Möglichkeiten für spontane, speziesnahe Tiermodelle.....	122
<b>4</b>	<b>IMPN-spezifischer Einsatz der WMI .....</b>	<b>126</b>
4.1	Detektion von Immunzellen durch die WMI .....	126
4.2	Detektion von AGA/AGKA durch die WMI.....	131
4.3	Kombination konventioneller fasermorphologischer Untersuchungen mit dem geweblichen Nachweis von Immunzellen und Autoantikörpern .....	137
4.4	Zytokinanalyse als Ergänzung und Bestätigung möglicher WMI-Ergebnisse .....	138
<b>5</b>	<b>Ausblicke .....</b>	<b>139</b>
5.1	Folgestudie für den Nachweis zirkulierender autoreaktiver Antikörper und Hinterleuchtung ihrer biologischen Bedeutung ....	139
5.2	Folgestudie zur Annäherung an immunogene Trigger .....	140
5.3	Folgestudie zur Modulation der Immunantwort .....	140
<b>VI</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>142</b>
<b>VII</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>145</b>
<b>VIII</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>147</b>
<b>IX</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>162</b>

---

<b>1</b>	<b>Methodische Ergänzungen.....</b>	<b>162</b>
1.1	Vorbereitung der Nervenfasern .....	162
1.1.1	Osmiumtetroxid-Färbung der NFZ .....	162
1.1.2	Hämatoxylin-Färbung der NFZ .....	162
1.2	Herstellung von NFZ .....	162
1.3	WMI-Protokoll .....	163
<b>2</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>165</b>
2.1	Verwendete Chemikalien .....	165
2.2	Verwendete Lösungen .....	168
2.3	Verwendete Geräte .....	170
2.4	Verwendete Software .....	170
<b>X</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>171</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AGA	Anti-Gangliosid-Antikörper
AGKA	Anti-Gangliosid-Komplex-Antikörper
aCIMP <sub>N</sub>	Chronische immun-medierte Polyneuropathien mit akutem Krankheitsbeginn
ACP	Akute kanine Polyradikuloneuritis
AIDP	Akute inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
AMAN	Akute motorische axonale Neuropathie
AMSAN	Akute motorische und sensorische axonale Neuropathie
Aqua bidest.	Bidestilliertes Wasser
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AvIDP	Aviäre inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie
CDR3	Komplementaritätsbestimmende Region 3
CHP	Kanine Coonhound Paralyse
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CSF	Liquor cerebrospinalis
CTL	Zytotoxische T-Zellen
CPG	Cytosin-Phosphat-Guanin
DAB	Diaminobenzidin
EAN	Experimentelle autoimmune Neuritis
EMG	Elektromyographie
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GN	Gelatine-Nanopartikel
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid

---

IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMPN	Immun-medierte Polyneuropathie
IVIg-Therapie	intravenöse Immunglobulin Therapie
MBP	Myelin-Basisches Protein
MFS	Miller-Fisher-Syndrom
NaOH	Natronlauge
NFZ	Nervenfaserzupfpräparationen
NPN	Nodal-paranodal
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PMP	Peripheres Myelin-Protein
PNS	Peripheres Nervensystem
Prot-K	Proteinase K
RAO	Rezidivierende Atemwegsobstruktion
RCF	Reversibler Leitungsblock
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion
SLK	Schmidt-Lantermann-Einkerbung
T <sub>REGS</sub>	Regulatorische T-Zellen
TH	T-Helfer-Zellen
TH-1	T-Helfer-Zellen vom Typ 1
TH-2	T-Helfer Zellen vom Typ 2
TH-17	T-Helfer Zellen vom Typ 17
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1
TNFR2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 2
WMI	Whole-Mount-Immunhistochemie



ZNS

Zentrales Nervensystem

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS – EINHEITEN

%	Prozent
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
M	Molare Masse
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
s	Sekunde

Die in den Artikeln verwendeten Abkürzungen finden sich im Anschluss an den jeweiligen Artikel.

## **I        EINLEITUNG**

Guillain-Barré-Syndrom (GBS)-artige Nervenwurzelerkrankungen sind die Hauptursache akut einsetzender, nicht-traumatischer Lähmungen bei Mensch, Hund und Katze. Trotz des oftmals gutartigen Verlaufs können Spätschäden, insbesondere bei der axonalen Variante, zurückbleiben.

Beim Menschen werden mehrere Subtypen unterschieden, wovon die akute inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (AIDP) in westlichen Ländern am häufigsten anzutreffen ist.

Analog zum GBS werden den immun-mediierten Polyneuropathien (IMPN) bei Tieren ursächlich Auseinandersetzungen mit immunologischen Triggern unterstellt, die die Immunantwort auf körpereigene Strukturen umlenken.

Die klinische, elektrodiagnostische und histopathologische Präsentation der kaninen und felines IMPN legt die Vermutung nahe, dass unterschiedliche Zielantigene am Krankheitsverlauf beteiligt sind. Eine genauere Erforschung und Charakterisierung dieser Läsionstypen ermöglicht neue Grundlagen für eine Rückverfolgung bis zum krankheitsauslösenden Antigen, als auch Möglichkeiten für neue Therapieansätze.

Ziel dieser Studie war es, die Schädigungstopographie an peripheren Nerven von Hunden und Katzen zu untersuchen und neue Verfahren zur Differenzierung der involvierten Immunmechanismen im Hinblick auf die Diagnostik, Krankheitsentwicklung, Therapierbarkeit und letztlich die Verwendung als natürliches GBS-Modell zu etablieren.

Die Studie soll die Diagnostik der IMPN und ihrer Subtypen bei klinisch erkrankten Hunden und Katzen erleichtern und objektivieren.

Möglichkeiten die sich aufgrund der hier vorgeschlagenen Subtypisierung und der Möglichkeit einer immunhistochemischen Untersuchung von Nervenfaserspuppräparationen (NFZ) ergeben, sind die Identifizierung krankheitsrelevanter, stadienspezifischer und prädiktiver Marker, sowie eine Interpretation des Verlaufs, hinsichtlich Krankheitsprogression, -stagnation, -remission und Genesung.

Im Gegensatz zu bisherigen GBS Tiermodellen würden die kaninen und felines IMPN die Grundvoraussetzung eines sporadisch vorkommenden Tiermodells mit Speziesnähe darstellen und könnten auf diese Weise entscheidende Hinweise zur Ätiopathogenese liefern.

## **II LITERATURÜBERSICHT**

### **1 GBS des Menschen**

#### **1.1 Bedeutung und Epidemiologie**

Mit einer Inzidenz von 1-2 Fällen pro 100.000 Einwohnern (GOVONI & GRANIERI, 2001; RINALDI, 2013) sind entzündliche Nervenerkrankungen aus dem Formenkreis des GBS die häufigste Ursache für akute schlaffe Lähmungen des Menschen in den sogenannten entwickelten Industriestaaten (HAFER-MACKO et al., 1996a; ANG et al., 2004; LUNN & WILLISON, 2009; ELDAR & CHAPMAN, 2014; WILLISON et al., 2016). Es handelt sich um eine immun-medierte Erkrankung der peripheren Nerven, die erstmals von G. Guillain, J. A. Barré und A. Strohl beschrieben wurde, und sowohl die Axone als auch die Myelinscheide betrifft (GUILLAIN et al., 1999; ANG et al., 2004). Charakteristisch für das GBS ist eine akut einsetzende schlaffe Lähmung der Gliedmaßen, oftmals zusammen mit kranialen und sensorischen Nervendefiziten, die ihren Höhepunkt innerhalb von 2-4 Wochen erreicht (FOKKE et al., 2014; WILLISON et al., 2016). Es erfolgt zumeist eine spontane Genesung, oft begünstigt durch immunmodulatorische Therapien wie der Plasmapherese oder der intravenösen Immunglobulin (IVIg)-Therapie (VAN DER MECHÉ & VAN DOORN, 1995; ANG et al., 2004). Trotz der heute vorhandenen gut ausgestatteten Intensivstationen und des zumeist gutartigen Krankheitsverlaufs, ist der Ausgang oft unbefriedigend, teilweise mit anhaltenden Behinderungen verknüpft (WILLISON et al., 2016) und es bleibt eine Mortalitätsrate zwischen 3-7 % (HUGHES & REES, 1997; ANG et al., 2004).

#### **1.2 GBS-Subtypen**

Es können beim GBS verschiedene Subtypen unterschieden werden, die mit einer unterschiedlichen klinischen und histopathologischen Präsentation einhergehen (WILLISON et al., 2016). Hier zu nennen sind vor allem die beiden häufigsten Formen: die AIDP und die akute motorische axonale Neuropathie (AMAN). Die Einteilung basiert auf elektrophysiologischen und

histopathologischen Studienergebnissen sowie dem Einsatz zusätzlicher Biomarker - hier vor allem GM1 und GD1a - für die Diagnose einer AMAN (WILLISON & YUKI, 2002; WILLISON et al., 2016).

Es existieren auch fokale Formen des GBS. Die hier wohl bekannteste Variante ist das Miller-Fisher-Syndrom (MFS), gekennzeichnet durch das Trias Ophthalmologie, Ataxie und Areflexie (FISHER, 1956).

Die verschiedenen klinischen Ausprägungsgrade der GBS-Subtypen können durch Unterschiede in der Verteilung der verantwortlichen Antigene verursacht werden, auch wenn diese bis jetzt noch nicht eindeutig identifiziert sind (HUGHES et al., 1999).

### **1.2.1 AIDP**

Die häufigste und damit klassische Form des GBS stellt sich als AIDP dar und wird vor allem in den westlichen Industriestaaten beobachtet. In Nordamerika und Europa beträgt der Anteil der Patienten, welche an dieser Form erkrankt sind bis zu 95 % (HADDEN et al., 1998; HUGHES & CORNBATH, 2005). Als Zielstrukturen der Immunattacke wurden hier Bestandteile der Myelinscheide sensorischer und motorischer Nerven identifiziert (HAFFER-MACKO et al., 1996b). Es wird vermutet, dass eine Infiltration von Lymphozyten mit nachfolgender Anlockung von Makrophagen einhergeht, die eine scheinbar intakte Myelinscheide attackieren (ASBURY et al., 1969; PRINEAS, 1972, 1981; HUGHES et al., 1999). Fraglich ist hier, ob Autoantikörper zu Zelloberflächen-Epitopen von Schwannzellen eine direkte Opsonisierung und nachfolgende Anlockung von Makrophagen bewirken können (HUGHES et al., 1999). Eine andere Erklärung bietet die experimentelle autoimmune Neuritis (EAN) mit einer T-Zell-induzierten Makrophagen-Anlockung und Beginn der Demyelinisierung durch Freisetzung von passenden Mediatoren (HUGHES et al., 1999). Einige Studien konnten diese T- und B-Zell-medierte Immunattacke der kompakten Myelinproteine P0, P2 und dem peripheren Myelin-Protein (PMP) 22 nachweisen (MAKOWSKA et al., 2008; WILLISON et al., 2016). Die Lymphozyteninfiltration führt nachfolgend zu einer Dysfunktion der Natriumkanäle, einer Ablösung der paranodalen Myelinschleifen mit Fehlern in der Ausbreitung von elektrischen Impulsen, endend in einem Leitungsblock (BRETTSCHEIDER et al., 2009). Klinisch erkenntlich wird die

vorangegangene Auseinandersetzung mit Infektionserregern in einer mit bis zu zweiwöchiger Latenz aufsteigenden, unterschiedlich stark ausgeprägten, bilateral symmetrischen, schlaffen Lähmung der Gliedmaßen. Ausgangspunkt ist hier meist die Beinmuskulatur mit einem Fortschreiten bis zu den oberen Extremitäten. Ebenfalls Teil dieser Form können geringgradige Sensibilitätsstörungen, Dysfunktionen des vegetativen Nervensystems sowie Paresen in den von Hirnnerven versorgten Regionen sein.

### **1.2.2 AMAN**

Axonale Varianten des GBS finden sich beim Menschen seltener, sind aber hinsichtlich der Zielantigene und der infektiösen Trigger besser erforscht (WILLISON et al., 2016). Sie treten regional gehäuft in China, Japan und Südamerika auf und werden in die akute motorische und sensorische axonale Neuropathie (AMSAN) und AMAN unterteilt (FEASBY et al., 1986; MCKHANN et al., 1991; MCKHANN et al., 1993; GRIFFIN et al., 1995; GRIFFIN et al., 1996a; DOUGLAS & WINER, 2006). Primäres Ziel der Immunattacke ist, im Gegensatz zur AIDP, in diesem Fall das Axolemma (WILLISON et al., 2016). Es wird vermutet, dass die gebundenen Anti-Gangliosid-Antikörper (AGA) nachfolgend zu einer Bindung von Komplement, Anlockung von Makrophagen und der Ablagerung des Membranangriffskomplexes C5b9 führen (MCGONIGAL et al., 2010; WILLISON et al., 2016). Eine Assoziation mit den auf dem Axolemma vorkommenden Gangliosiden konnte durch eine therapeutische Injektion von Rinderhirngangliosidextrakt hergestellt werden, die bei neurologischen Patienten eine AMAN auslöste (ILLA et al., 1995). Krankheitsbild und -verlauf der AMAN unterscheiden sich dahingehend von der AIDP, dass hier nur motorische Nerven betroffen sind und eine Beteiligung des autonomen Nervensystems selten ist (COSI & VERSINO, 2006). Zudem geht sie mit einem schwereren klinischen Erscheinungsbild und mit einer deutlich verzögerten Erholung einher (TEKGUL et al., 2003; NAGASAWA et al., 2006; YE et al., 2013). Diese führt sich auf die eingeschränkte Fähigkeit zur axonalen Regeneration, vor allem bei proximaler Degeneration nahe der ventralen Nervenwurzel, zurück (KUWABARA, 2004; COSI & VERSINO, 2006; GESELLSCHAFT FÜR NEUROPÄDIATRIE et al., 2012; WILLISON et al., 2016).

### **1.3 Ätiopathogenese des GBS**

#### **1.3.1 Derzeitige Kenntnisse zur Immunbiologie des GBS**

##### **1.3.1.1 Theorien zur molekularen Mimikry**

Nach derzeitigem Kenntnisstand handelt es sich beim GBS um eine Autoimmunerkrankung, die durch eine Auseinandersetzung des Immunsystems mit Infektionserregern, Umweltantigenen und seltener auch Impfstoffen ausgelöst wird (SEJVAR et al., 2011a). Als möglicher Mechanismus wird hier die molekulare Mimikry zwischen nicht-körpereigenen Antigenen und körpereigenem Gewebe des Wirts genannt (ANG et al., 2004). Antikörper oder T-Zellen, deren Bildung aufgrund einer der oben erwähnten Auseinandersetzungen des Immunsystems mit bestimmten Antigenen initiiert wurde, um diese Substanzen aus dem Körper zu entfernen, erfahren über die molekulare Mimikry eine Umleitung der Immunantwort auf körpereigene Antigene mit nachfolgender Zerstörung von körpereigenem Gewebe (ANG et al., 2004; SHAHRIZAILA & YUKI, 2011). Im Falle des GBS stellen diese essentielle Myelinbestandteile oder Antigene der Axonmembranen dar (ZHANG et al., 2010; ZHANG et al., 2013), deren Zerstörung zunächst mit dem Verlust der elektrophysiologischen Leitfähigkeit und später sogar mit dem Verlust der Nervenfasern einhergeht (KIEFER et al., 2001).

Relevante bakterielle und virale Trigger sind unter anderem *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), *Cytomegalovirus*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Epstein-Barr Virus* oder auch das *Humane-Immundefizienz Virus* (LUNN & WILLISON, 2009). Ebenso kann eine vorangehende Infektion sowohl den klinischen Phänotyp als auch die Prognose bestimmen (WILLISON et al., 2016). *C. jejuni* ist eine der am ausgiebigsten untersuchten, dem GBS vorangehenden Infektionen (ANG et al., 2004). Verantwortlich gemacht wird hier die Bakterienwand, die Lipooligosaccharide enthält, die wiederum in ihrer Zusammensetzung den Gangliosiden im peripheren Nervensystem ähneln (YUKI et al., 1993; HUGHES et al., 1999; ANG et al., 2004). GBS in Zusammenhang mit einer *C. jejuni* Infektion führt meist zur Ausbildung der motorisch axonalen Form, mit einer stark ausgeprägten Schwäche der Gliedmaßen, AGA gegen GM1 und GD1a und einer schlechteren Prognose



(JACOBS et al., 1996; HO et al., 1999; WILLISON et al., 2016).

Bezüglich möglicher Zusammenhänge zwischen Impfung und Entwicklung des GBS gibt es Berichte zu einer Inzidenzerhöhung des GBS nach Impfung mit bestimmten Stämmen eines H1N1 Influenza A Schweinegrippe-Impfstoffs in den USA im Jahre 1976 (KAPLAN et al., 1982; KAPLAN et al., 1983; LANGMUIR et al., 1984; HUGHES et al., 1999). Deutlichere Hinweise lieferte der Nachweis von Antikörpern gegen das Myelin-Basische Protein (MBP) und Galactocerebrosiden in Serum und Liquor cerebrospinalis (CSF) bei Impfung mit einem Tollwut-Impfstoff, welcher murine Myelin-Proteine enthielt (HEMACHUDHA et al., 1988; HUGHES et al., 1999).

Trotz dieser bekannten Zusammenhänge spielen auch noch genetische und durch die Umwelt bedingte Faktoren eine Rolle in Bezug auf die Empfänglichkeit und damit der Wahrscheinlichkeit, diese immun-medierte Erkrankung zu entwickeln (BLUM & MCCOMBE, 2014; WILLISON et al., 2016).

### **1.3.1.2 Beteiligte Immunzellen**

#### **1.3.1.2.1 T-Helferzellen Typ 1 (TH-1) Dominanz und TH-1/TH-2 Paradigma**

Bislang wurde angenommen, dass es sich beim GBS bzw. vor allem bei der AIDP, um eine T-Helfer-Zell-1 (TH-1, CD4-positiv) dominierte Erkrankung handelt (ZHANG et al., 2013). Allerdings können nicht alle Veränderungen auf eine von TH-1 geprägte akute Phase oder eine TH-1/T-Helfer Zellen vom Typ 2 (TH-2, CD4-positiv) Imbalance zurückgeführt werden (ZHANG et al., 2013). Gestützt wird diese Hypothese auch durch die Entdeckung einer neuen TH-Effektorzelllinie, den T-Helfer Zellen vom Typ 17 (TH-17, CD4-positiv) (ZHANG et al., 2011).

Dem TH-1/TH-2 Paradigma zufolge ist die Frühphase des GBS durch eine Aktivierung der TH-1 gekennzeichnet (GIGI et al., 2008; NYATI et al., 2012; ZHANG et al., 2013). Es erfolgt eine Amplifizierung der Immunantwort mit nachfolgender Zytokinausschüttung und Aktivierung von Effektormakrophagen sowie der zytotoxischen T-Zellen (CTL; CD8-positiv). Die aktivierten Makrophagen können proinflammatorische Zytokine bilden und führen über eine Generierung von freien Radikalen zu einer inflammatorischen Schädigung

der peripheren Nerven oder aber sie attackieren die Myelinscheide direkt (KIEFER et al., 2001; WILLISON et al., 2016). Diese Immunreaktion ist in der Regel selbstlimitierend oder seltener nicht-progressiv. Die Erholungs- oder Plateauphasen des GBS konnten auf einen Wechsel von TH-1-medierten Reaktionen zu einer Dominanz von TH-2 zurückgeführt werden, die mit einer attenuierenden humoralen Immunantwort einhergeht (GIGI et al., 2008; NYATI et al., 2012; ZHANG et al., 2013).

Die Differenzierung der unterschiedlichen T-Zell Subpopulationen wird maßgeblich durch das vorherrschende Zytokinmilieu bestimmt (ZHANG et al., 2013). Hierbei sind unter anderem Interleukin (IL)-6 und IL-12 sowie der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) involviert, die schon für sich alleine genommen eine Demyelinisierung induzieren können (ZHANG et al., 2013). TH-1 Zellen, die den akuten Schub bewirken, entwickeln sich bei Überwiegen eines IL-12 Zytokinmilieus. Zusätzlich sind die TH-1-Zytokine IL-12, TNF- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) für die Aktivierung der Makrophagen, die in die Myelinspirale eindringen, zuständig (ZHANG et al., 2011). Bei einer IL-4 Prädominanz erfolgt eine zunehmende Proliferation von TH-2 mit Einstieg in die humoral-vermittelte Remissionsphase, die bestenfalls zu einer Genesung führt. IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, die den TH-2 entstammen, resultieren in einem Immunglobulinwechsel von Immunglobulin (Ig)E zu IgG, einer B-Zell-Aktivierung und der Herabregulation der Makrophagen-Aktivität (ZHANG et al., 2011). Dieser TH-1 zu TH-2-Shift konnte sowohl im Nagermodell (ZHU et al., 1997; ZHU et al., 1998; ZHANG et al., 2013), als auch bei der aviären Form nachgezeichnet werden (BADER et al., 2010).

#### **1.3.1.2.2 T-Helferzellen Typ 17 (TH-17)**

Neuere Studien indizieren zudem eine Mitwirkung von TH-17 an der Pathogenese des GBS und der EAN (ZHANG et al., 2013). Zu ihren Aufgaben gehört eine Elimination der Pathogene, die der TH1- und TH2-Immunantwort entkommen sind (KORN et al., 2009) über die Produktion von IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-21, IL-22, TNF- $\alpha$  und dem Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF) (YANG et al., 2008; LEIPE et al., 2010; ZHANG et al., 2013). Diese erfolgt über die Induktion einer lokalen Entzündungsreaktion und der Unterstützung von B-Zellen in der Antikörper-Produktion (DOREAU et al., 2009;

ZHANG et al., 2013). Eine Differenzierung von TH-17 kann unter dem Einfluss von TNF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21 und/oder IL-23 eingeleitet werden, die andererseits bei einer Fülle von Autoimmunreaktionen eine Rolle zu spielen scheinen (WANG et al., 2013). Entsprechend geht die zellgeprägte akute Phase des GBS mit einer TH-17 und IL-17A Erhöhung im Blut der Patienten einher (LI et al., 2012; ZHANG et al., 2013). Eine IVIg-Therapie führte wiederum zu einem Absinken von TH-17 und IL-17 (ZHANG et al., 2013; LI et al., 2014).

#### **1.3.1.2.3 Regulatorische T-Zellen (T<sub>REGS</sub>)**

Eine zusätzliche Bedeutung kommt den antagonistisch zu TH-1 und TH-17 wirkenden regulatorischen T-Zellen (T<sub>REGS</sub>) zu. Sie erhalten das immunologische Gleichgewicht und schützen vor Autoimmunkrankheiten durch eine Unterdrückung von autoreaktiven T-Zellen (SAKAGUCHI et al., 2006; ZHANG et al., 2013), genauer gesagt verhindern sie die Antigen-spezifische T-Zell-Proliferation und unterdrücken die TH-1- und TH-2- spezifische Zytokinproduktion (ZHANG et al., 2013). Im Falle des GBS kommt es zu einer Verminderung von T<sub>REGS</sub> zusammen mit einem erhöhten Vorkommen von TH-1 und TH-17 (HARNESS & MCCOMBE, 2008; MADDUR et al., 2014). GBS-Patienten, die einer Behandlung mit IVIg unterzogen wurden, zeigen wiederum eine Abnahme von TH-1 und TH-17 mit einem gleichzeitigen Anstieg von T<sub>REGS</sub> (MADDUR et al., 2014). Tierversuche haben ebenfalls gezeigt, dass eine Korrelation zwischen einem Absinken der IL-17A Konzentration (durch Valproinsäure und Atorvastatin bei der EAN) und der Hochregulierung der T<sub>REGS</sub> besteht (ZHANG et al., 2008; LI et al., 2011). T<sub>REGS</sub> sind demnach wieder vermehrt in der Remissionsphase anzutreffen, was letztendlich auch eine Rolle für den selbstlimitierenden monophasischen Krankheitsverlauf spielen dürfte (LI et al., 2011; ZHANG et al., 2013).

#### **1.3.1.3 GBS-assozierte Autoantikörper**

##### **1.3.1.3.1 Anti-Gangliosid-Antikörper (AGA)**

In den letzten Jahren kam vermehrt die Frage auf, ob das GBS nicht eher den humoral-medierten Erkrankungen anstatt, wie ursprünglich angenommen, den T-Zell-medierten Erkrankungen zuzuordnen wäre (WILLISON et al., 2016). Beweise hierfür bietet die Detektion von AGA, deren Entstehung auf die oben

genannte molekulare Mimikry (1.3.1.1) zurückzuführen ist (GOODYEAR et al., 1999; HALSTEAD et al., 2004; SUSUKI et al., 2007; YUKI, 2007; RINALDI et al., 2013). Zusätzlich einzubeziehen ist eine Ambivalenz der humoralen Immunantwort bei den verschiedenen GBS-Subtypen. Bislang wurden vor allem die folgenden IgG-AGA bei Patienten mit GBS detektiert: GM1, GM2, GM4, GD1b, GD1a, GalNac-Gd1a, GQ1b, GT1a und Sulfatide (CAUDIE et al., 2002; HIRAGA et al., 2005; RINALDI, 2013). Während AGA bei AIDP-Patienten nur selten nachzuweisen sind, sind AGA bei AMAN- und MFS-Patienten regelmäßig detektierbar (RINALDI et al., 2011). Es existiert hier bereits eine Zuordnung von Anti-GM1-, Anti-GM1b- und Anti-GD1a-AGA zu den axonalen Formen des GBS (YUKI et al., 1999; JACOBS et al., 2008; JOHANNIS et al., 2014), während die Anti-GQ1b-AGA bei Ihrem Auffinden auf das MFS hinweisen (CHIBA et al., 1993). Für die AIDP wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt kein spezifischer Antikörper detektiert (HUGHES et al., 1999; WILLISON et al., 2016). Funktionell wird angenommen, dass die immunologische Kaskade bei der AMAN zu einer Unterbrechung der physiologischen und anatomischen Nervenfaserintegrität der betroffenen axolemmalen Membranen im Bereich des Ranvierschen Schnürrings und der Nervenendigungen mit nachfolgendem Leitungsblock führt (WILLISON et al., 2016). Dieser Leitungsblock kann entweder reversibel sein oder aber er resultiert in einer axonalen Degeneration mit unvollständiger Erholung (WILLISON et al., 2016).

#### **1.3.1.3.2 Anti-Gangliosid-Komplex-Antikörper (AGKA)**

Einen neuen Anstoß im Hinblick auf die Beteiligung von Autoantikörpern an der Krankheitsentstehung und -progression der AIDP geben die jüngst beschriebenen Anti-Gangliosid-Komplex-Antikörper (AGKA), die mit den bislang gängigen Testsystemen nicht nachgewiesen werden konnten (RINALDI et al., 2011). Demnach können einige Antikörper einzelne, isolierte Ganglioside nicht binden, wohingegen die Bindung in Anwesenheit eines zweiten Gangliosids sehr wohl möglich ist (KAIDA et al., 2004, 2007; RINALDI et al., 2011; RINALDI et al., 2013). In neueren Studien wurden bei über 60 % der elektrodiagnostisch subtypisierten AIDP-Seren AGKA nachgewiesen (RINALDI et al., 2013). Im Vergleich hierzu wurde bei der Verwendung von Einzel-Gangliosid-Antikörpern bei derselben Gruppe nur eine Erfolgsquote von 11 %

erzielt (RINALDI et al., 2013). Gleichbleibend festzustellen ist bei der Verwendung von kombinierten Glykoarrays für die Detektion von AGA und AGKA eine deutliche Verbindung zwischen Anti-GM1-AGA und dem axonalen GBS-Subtyp (RINALDI et al., 2013). Im Hinblick darauf, dass Ganglioside dazu neigen in der Zellmembran mit Komponenten wie Cholesterol sogenannte „Lipid Rafts“ zu bilden (KUSUNOKI et al., 2008), kann die verbesserte Detektion durch Verwendung von AGKA nachvollzogen werden (RINALDI et al., 2013). Wenn nun die AGKA an die durch mehrere Ganglioside neu gebildeten Epitope in diesen „Lipid Rafts“ effizienter binden können, kann dies der Grund für Fehler in der Nervenleitgeschwindigkeit und einen schwereren Verlauf des GBS darstellen (KUSUNOKI et al., 2008). Die Detektion von AGKA ist daher von besonderer Bedeutung für die Aufarbeitung von elektrodiagnostisch bestätigten AIDP-Patienten im Hinblick auf die Ätiopathogenese und die Entwicklung neuer diagnostischer Biomarker für diesen Subtypen (RINALDI, 2013; WILLISON et al., 2016).

#### **1.4 Diagnose des GBS**

Der diagnostische Schwerpunkt liegt auf dem klinischen Erscheinungsbild der Erkrankung, gefolgt von elektrodiagnostischen Untersuchungen zur Subtypisierung, da diagnostische Biomarker nicht für alle Subtypen zur Verfügung stehen (FOKKE et al., 2014; WILLISON et al., 2016).

Essentiell für die Patienten ist eine möglichst rasche Diagnosestellung (WILLISON et al., 2016). Dies ist bei eindeutigen Fällen meist kein Problem, schwieriger wird es bei den atypischen Fällen oder Erkrankungen von Kindern (WILLISON et al., 2016). Die Symptome können sich beispielsweise bei Vorschulkindern zu Beginn eher unspezifisch in einem Gehunwillen und Beinschmerzen manifestieren (GESELLSCHAFT FÜR NEUROPÄDIATRIE et al., 2012; WILLISON et al., 2016).

Durch die divergenten diagnostischen Zeitfenster der Untersuchungsverfahren, die uneinheitliche Präsentation und auch den Mangel an praxisnahen Diagnosestandards können sich für den Patienten in der Zuordnung der Krankheitsursache kritische Verzögerungen ergeben, die das Ansprechen auf die Immuntherapie und damit die Prognose und Lebensqualität der Patienten und ihres sozialen Umfeldes negativ beeinflussen können (FOKKE et al., 2014;

WANG et al., 2015). Hinzu kommt, dass dem GBS eine Reihe klinisch und auch pathobiologisch variierender Unterformen zugeordnet werden (YUKI & HARTUNG, 2012; FOKKE et al., 2014). So unterscheiden sich die einzelnen Subtypen durch Ausbreitung und Verteilung der Schwäche, dem Vorhandensein einer autonomen Dysfunktion, Hirnnervendefiziten und dem Vorkommen von sensorischen Ausfällen (FOKKE et al., 2014).

#### **1.4.1 Klinische Präsentation und Differentialdiagnosen**

Klinisches Schlüsselkriterium ist die schnell fortschreitende, bilaterale Schwäche (über maximal vier Wochen, Beginn typischerweise in den unteren Extremitäten) sowie der Verlust der distalen Muskeleigenreflexe und der Ausschluss einer alternativen Lähmungsursache (ASBURY & CORNBLATH, 1990; HUGHES & CORNBLATH, 2005; SEJVAR et al., 2011b; RINALDI, 2013; VAN DOORN, 2013; FOKKE et al., 2014; WILLISON et al., 2016). Hilfreiche Zusatzdiagnostika sind ein monophasischer Krankheitsverlauf, eine reduzierte motorische Nervenleitgeschwindigkeit, ein partieller Leitungsblock, verlängerte oder fehlende F-Wellen und/oder verlängerte distal-motorische Latenzen, eine zytoalbuminäre Dissoziation im CSF und das Vorkommen zirkulierender AGA (ASBURY & CORNBLATH, 1990; HUGHES & CORNBLATH, 2005; HIRSCHVOGEL, 2012). Die Gesichtsnerven können ebenfalls betroffen sein und auch eine autonome Dysfunktion kann vorkommen (ELDAR & CHAPMAN, 2014).

Die Differentialdiagnosenliste ist lang und die Diagnosefindung impliziert einen Ausschluss von Gehirnstamm- und Rückenmarksläsionen, Defekten der motorischen Endplatte, als auch muskulären Veränderungen (ELDAR & CHAPMAN, 2014). Innerhalb des Überbegriffs der „akuten peripheren Neuropathien“ müssen noch toxische Neuropathien, Vaskulitis, metabolische Veränderungen, Porphyrie, Diphtherie und eine durch Zecken bedingte Paralyse ausgeschlossen werden (ELDAR & CHAPMAN, 2014).

#### **1.4.2 Liquordiagnostik**

Für den Ausschluss von Differentialdiagnosen (v. a. der infektiösen Polyradikuloneuritiden) kann eine Lumbalpunktion mit CSF-Gewinnung hilfreich sein (GUILLAIN et al., 1999; ELDAR & CHAPMAN, 2014; FOKKE et al., 2014).

Hierbei ist zu beachten, dass die Liquorentnahme erst eine Woche nach Beginn der Symptome durchgeführt wird, da anderenfalls der Proteingehalt noch nicht erhöht ist (BRETTSCHEIDER et al., 2009; ELDAR & CHAPMAN, 2014). Bei Beachtung des richtigen Entnahmezeitpunktes erreicht die Liquordiagnostik eine Sensitivität von 80 % (FOKKE et al., 2014). Ein typischer Untersuchungsbefund bei Patienten mit GBS ist eine isolierte Proteinerhöhung bei weitestgehend normaler Zellzahl (zytoalbuminäre Dissoziation) (FOKKE et al., 2014). Im Anschluss an die Liquorentnahme sollte die elektrodiagnostische Untersuchung erfolgen (ELDAR & CHAPMAN, 2014). Sie ist essentiell für eine Bestätigung der Diagnose und die Einteilung in demyelinisierende oder axonale Subtypen (ELDAR & CHAPMAN, 2014).

#### **1.4.3 Elektrophysiologische GBS-Subtypen**

Eine Subtypisierung des GBS ist bislang nur durch eine elektrodiagnostische Untersuchung möglich (WILLISON et al., 2016). Hierbei soll vor allem eine Differenzierung zwischen axonalen und demyelinisierenden Subtypen erfolgen (FOKKE et al., 2014) (Tabelle 1).

Nichtsdestotrotz gibt es eine Vielzahl an Patienten mit diagnostiziertem GBS aber ohne die Möglichkeit einer Subtypisierung. Dies liegt zum einen daran, dass die peripheren Nerven bereits so stark betroffen sind, dass sie unerregbar geworden sind oder sie stellen sich während der Untersuchung physiologisch unauffällig dar (FOKKE et al., 2014; WILLISON et al., 2016). Problematisch ist weiter das Fehlen von international einheitlich definierten elektrophysiologischen Kriterien für die GBS-Diagnostik (FOKKE et al., 2014). Zusätzlich sind die elektrodiagnostischen Untersuchungsergebnisse oft missverständlich, können sich im Verlauf der Erkrankung verändern und zeigen ein AIDP-Muster früh und ein AMAN-Muster mit einem reversiblen Leitungsblock spät an (UMAPATHI et al., 2012; UNCINI, 2012; FOKKE et al., 2014; WILLISON et al., 2016). Daher kann sich beispielweise eine entzündliche Schädigung der glialen und axonalen Membranen im Bereich des Ranvierschen Schnürrings in vergleichbaren elektrodiagnostischen Untersuchungsergebnissen (reversibler Leitungsblock (RCF)) äußern (WILLISON et al., 2016). Des Weiteren können bei schweren Läsionen sowohl Axon als auch die Myelinscheide zerstört sein, was wiederum die

Unterscheidung zwischen primär demyelinisierenden und axonalen Erkrankungen erschwert (HUGHES et al., 1999). Aus diesem Grund ist es essentiell, serielle elektrodiagnostische Untersuchungen vorzunehmen (UNCINI et al., 2013; WILLISON et al., 2016). Auch für GBS-Fälle, die zu Beginn mehrdeutige elektrodiagnostische Untersuchungsergebnisse liefern ist bei der Mehrzahl eine Subtypisierung nach Durchführung von seriellen Untersuchungen möglich (FOKKE et al., 2014). Nur durch serielle Untersuchungen ist eine verlässliche Korrelation zwischen dem Auffinden von AGA/AGKA, den histopathologischen und elektrodiagnostisch ermittelten Subtypen möglich (RINALDI et al., 2013).

**Tabelle 1. Elektrodiagnostische Kriterien für die Subtypisierung.**

<b>Elektrodiagnostische Kriterien</b>	
AIDP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multifokale Verminderung der Nervenleitgeschwindigkeit</li> <li>• Partieller Leitungsblock</li> <li>• Verlängerte distale motorische Latenz</li> <li>• Verlängerte F-Wellen-Latenz</li> <li>• Erhöhte temporale Dispersion</li> </ul> <p>(HUGHES et al., 1999; NACHAMKIN et al., 2007; WILLISON et al., 2016)</p>
AMAN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keine der unter AIDP genannten Kriterien für eine Demyelinisierung</li> <li>• Verringerung der distal provozierten Muskelsummenaktionspotentiale (CMAP) (reduziert in mindestens zwei Nerven, auf weniger als 80 % des unteren Limits des Normwertes)</li> <li>• Erhaltene Nervenleitgeschwindigkeit</li> <li>• RCF</li> <li>• Falls das distale CMAP weniger als 10 % des unteren Limits des Normwertes beträgt, ist ein demyelinisierendes Kriterium in einem Nerven erlaubt</li> </ul> <p>(HADDEN et al., 1998; HO et al., 1999; HUGHES et al., 1999; WILLISON et al., 2016).</p>



#### **1.4.4 Nervenbiopsie und histopathologische GBS Subtypen**

Nervenbiopsien gehören nicht zu der Standardabklärung des GBS (SOMMER et al., 2010). Dennoch können sie entscheidende Erkenntnisse im Hinblick auf die Subtypisierung liefern, bzw. ist auch zu klären, inwieweit klinische, elektrophysiologische und histopathologische Subtypen korrelieren (GRIFFIN et al., 1995; FOKKE et al., 2014). NFZ liefern hierbei wichtige Erkenntnisse in Bezug auf die longitudinale Schädigungstopographie der unterschiedlichen Subtypen (HAFFER-MACKO et al., 1996a). Leider sind solche Untersuchungen beim Menschen wegen der geringen Verfügbarkeit von (frühen) Nervenbiopsien der unterschiedlichen Subtypen rar und die Annahmen basieren daher oft auf Tiermodellen (GRIFFIN et al., 1995; HAFFER-MACKO et al., 1996a; HAFFER-MACKO et al., 1996b; WILLISON, 2012).

Die Schädigungsbilder der peripheren Nerven und Nervenwurzeln beruhen auf einer unterschiedlichen Beteiligung von Immunzellen und Antikörpern (HUGHES et al., 1999; ZHANG et al., 2013). Axonalen Formen (AMAN, AMSAN) wird ein humoraler Schädigungsmechanismus zugesprochen (SEKIGUCHI et al., 2012; ZHANG et al., 2013), wohingegen bei der AIDP eine vor allem durch T-Helfer-Zellen (TH) dominierte Immunantwort mit nachfolgender Makrophagen-Aktivierung und Komplementsystem-induzierter Demyelinisierung vorliegen soll (HUGHES et al., 1999; ZHANG et al., 2013).

Eine Studie hat 12 chinesische Patienten, die an GBS erkrankt waren, klinisch, elektrodiagnostisch und histopathologisch untersucht (GRIFFIN et al., 1995). Die von diesen Patienten entnommenen Gewebeproben wurden für NFZ, Elektronenmikroskopie und immunhistochemische Untersuchungen vorbereitet (GRIFFIN et al., 1995). Drei dieser in der Studie untersuchten chinesischen Patienten deckten sich histopathologisch mit einer AIDP, drei mit einer AMAN, drei mit einer AMSAN und die restlichen drei Patienten zeigten nur minimale Veränderungen (nodale Erweiterungen, Degeneration der motorischen Fasern) (GRIFFIN et al., 1995).

Die AIDP-Fälle präsentierten sich mit einer charakteristischen lymphozellulären Infiltration gepaart mit einer Makrophagen-medierten Demyelinisierung (GRIFFIN et al., 1995). Eine Vorherrschaft von TH-Zellen bei Krankheitsentstehung und Progression des am häufigsten verwendeten

Tiermodells für die AIDP, der EAN, erklärt aber nicht die durch Makrophagen-initiierte Demyelinisierung (HUGHES et al., 1999). Post mortem Studien derselben Forschungsgruppe an drei weiteren AIDP-Patienten schlagen eine Antikörper-medierte Komplementfixierung mit Lokalisation an der äußeren Schwannzellmembran und nachfolgender vesikulärer Myelindegeneration als mögliche Erklärung für dieses Phänomen vor (HAFFER-MACKO et al., 1996b; HUGHES et al., 1999). Diese Veränderungen zogen eine Invasion von Makrophagen nach sich, die im Gegensatz zur AMAN nicht periaxonal lokalisiert war (HAFFER-MACKO et al., 1996b). Zusätzlich können Makrophagen die Myelinscheide auch direkt attackieren, oder sie können proinflammatorische Zytokine, wie die toxisch wirkenden Substanzen TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 freisetzen (KIEFER et al., 2001; ZHANG et al., 2010; ZHANG et al., 2013). Eine Erklärung für die vordergründige Rolle der TH-Zellen in der EAN könnte ihre Rolle bei dem Zusammenbrechen der Blut-Nerven-Schranke mit einem sich daraus ergebenden erleichterten Eintritt für die Antikörper bieten (SPIES et al., 1995; HAFFER-MACKO et al., 1996b).

Die bei den axonalen Formen in einem geringeren Ausmaß vorkommenden zellulären Akteure lassen auf eine humorale Dominanz an der Krankheitsentstehung und -progression schließen (HAFFER-MACKO et al., 1996a). Dafür spricht außerdem die Wirksamkeit einer IVIg-Therapie und Plasmapherese (DOUGLAS & WINER, 2006), das Auffinden von C5b9 Komplexen im CSF (SANDERS et al., 1986; HAFFER-MACKO et al., 1996b) und Serum (KOSKI et al., 1987; HAFFER-MACKO et al., 1996b), das erhöhte Vorkommen von den Komplementaktivierungsprodukten C3a und C5a im CSF (HARTUNG et al., 1987; HAFFER-MACKO et al., 1996b) und die Ablagerung von Ig und Komplement auf der Myelinscheide bei GBS-Patienten (LUIJTEN & BAART DE LA, 1972; NYLAND et al., 1981; KOSKI et al., 1987; HAYS et al., 1988; HAFFER-MACKO et al., 1996b). Insgesamt wurden zehn AMAN-Nervenbiopsien histopathologisch untersucht (GRIFFIN et al., 1995; HAFFER-MACKO et al., 1996a). Erstaunlicherweise wiesen diese, im Krankheitsverlauf früh entnommenen AMAN-Nervenbiopsien (alle Patienten waren 12 Tage nach Beginn der Symptome verstorben), eine periaxonale Makrophagenansammlung und Aufweitung der Nodien auf (GRIFFIN et al., 1995; HAFFER-MACKO et al., 1996a; WILLISON, 2012). Zusätzlich zeigten immunhistochemisch gefärbte

NFZ eine Ablagerung von IgG und Komplementaktivierungsprodukten auf dem Axolemma (nodal und internodal) von intakten großen motorischen Nervenfasern (HAFFER-MACKO et al., 1996a). Die Lokalisation von IgG, Komplementprodukten und Makrophagen in dieser Region lässt vermuten, dass die Zielantigene im nodalen und internodalen Axolemma liegen, wohingegen sie bei der AIDP vermutlich im Schwannzellplasmalemma liegen (HAFFER-MACKO et al., 1996a). Die Autoren vermuten hier, dass die Makrophagen sekundär durch die abgelagerten Komplementaktivierungsprodukte chemotaktisch angelockt werden (HAFFER-MACKO et al., 1996a). In den fortgeschrittenen Stadien der AMAN wird das histologische Bild von einer Wallerschen Degeneration der motorischen Fasern mit einem Aussparen der dorsalen Nervenwurzeln und der sensorischen Nerven dominiert (GRIFFIN et al., 1995). Dies erklärt auch die in einigen Fällen rasche Genesung von AMAN-Patienten bedingt durch die in frühen Stadien noch reversiblen Veränderungen und die schlechte Prognose bei Vorliegen einer Wallerschen Degeneration (GRIFFIN et al., 1996b). Bei AMSAN-Patienten waren motorische und sensorische Nerven in gleichem Ausmaß betroffen, vor allem Nervenfasern der hinteren Wurzel (Radix posterior) und des Hinterstrangs (Funiculus posterior) zeigten eine massive Nervenfaserdegeneration (GRIFFIN et al., 1995). Eine weitere Bestätigung der humoralen Krankheitsentstehung liefert die Detektion von AGA/AGKA im Serum der axonalen GBS-Subtypen sowie eine Induktion von axonalem GBS nach Injektion von GM1-Gangliosiden in Tiermodellen (YUKI et al., 2001; JACOBS et al., 2008; RINALDI, 2013; JOHANNIS et al., 2014). Insgesamt lassen die bisherigen Forschungsergebnisse vermuten, dass es sich bei der AMAN um eine IgG- und Komplement-medierte Erkrankung handelt, deren Zielstrukturen Teil des Axolemmas von motorischen Nervenfasern sind (HAFFER-MACKO et al., 1996a).

#### **1.4.5 Serologische Tests**

Die Hauptquellen für eine Biomarker-basierte GBS-Diagnose sind CSF, Serum und periphere Nerven (WANG et al., 2015). Viele der hier in Frage kommenden Biomarker wurden bislang aber nur an Tiermodellen überprüft, oft existieren nur wenige Studien an GBS-Patienten zu den jeweiligen Markern, es existiert kein Standardprotokoll für die Messung von Biomarkern und die verschiedenen

Untersuchungsmethoden können sich widersprechende Ergebnisse liefern und sind daher noch nicht für eine Verwendung in der Routinediagnostik verfügbar (WANG et al., 2015). Bislang steht daher vor allem die Überprüfung auf Vorkommen von AGA/AGKA in Zusammenhang mit einer GBS-Diagnose im Vordergrund. Ein Screeningtest auf AGA/AGKA ist aus diesen Gründen ein wertvolles diagnostisches Tool für die Aufarbeitung eines Falles (RINALDI et al., 2013; JOHANNIS et al., 2014). Biomarker leisten einen Beitrag in Bezug auf eine weitere Aufklärung der Ätiopathogenese, sie sichern die klinische Diagnose ab und unterstützen bei der Subtypisierung (BRETTSCHEIDER et al., 2009). Bei kommerziellen Testkits liegt die Sensitivität für das Auffinden von AGA bei Patienten mit diagnostizierter Polyneuropathie bei 43 % und die Spezifität bei 77 %. Mit einem positiven und negativen prädiktiven Wert von 22 % und 90 % ist hier ein Einsatz in der Diagnostik durchaus gerechtfertigt (JOHANNIS et al., 2014). Bei Patienten mit GBS wurden in 38 % der Fälle AGA nachgewiesen (JOHANNIS et al., 2014). Eine Verbesserung bietet die Verwendung von kombinierten Glykoarrays, die sowohl AGA als auch AGKA in GBS-Patienten nachweisen konnten (RINALDI et al., 2013). Dies gilt es in den nächsten Jahren besonders im Falle von AIDP-Patienten zu berücksichtigen, da hier mit den kombinierten Glykoarrays eine Erhöhung des Antikörpernachweises auf 62 % im Vergleich zu 11 % mit ELISA Verfahren erzielt wurde (RINALDI et al., 2013). Ein Problem bei der Verwendung von verschiedenen Testsystemen, wie beispielweise ELISA oder Glykoarray ist, dass die unterschiedlichen Oberflächen auch das Antikörperbindungsmuster beeinflussen und so zu heterogenen Ergebnissen führen (RINALDI et al., 2013). Ebenso ist der Einsatz als alleinstehendes Diagnosekriterium noch nicht ausreichend abgesichert und ist immer in Zusammenhang mit Klinik und Elektrodiagnostik zu interpretieren (JOHANNIS et al., 2014).

### **1.5 Allgemeines zur Therapie und Prognose des GBS**

Korrespondierend zu dem Konzept der Autoimmunerkrankung können die Nervenschädigungen im Zuge des GBS durch Immunsuppression und/oder immunmodulatorische Therapien, hier ist vor allem die IVIg-Therapie und die Plasmapherese zu nennen, abgeschwächt werden (DOUGLAS & WINER, 2006; HIRSCHVOGEL, 2012). Steroide haben für GBS-Patienten als orale

Therapie oder Infusion mit Methylprednisolon keinen zusätzlichen Benefit, vermutlich durch negative Effekte auf die Muskulatur, die die antiinflammatorische Komponente wieder relativieren (HUGHES & VAN DOORN, 2012; WILLISON et al., 2016). Grundsätzlich sollte die Plasmapherese oder die IVIg-Therapie möglichst früh begonnen werden, bevor die Nerven bereits irreversibel geschädigt sind (WILLISON et al., 2016).

Das GBS ist eine lebensbedrohende Erkrankung mit einer Sterblichkeitsrate von 3-7% in Europa und Nordamerika (ISLAM et al., 2010; NETTO et al., 2011; VAN DEN BERG et al., 2013; BENAMER & BREDAN, 2014; WILLISON et al., 2016). Hinsichtlich der Langzeitprognose gibt es bei Kindern keine Unterschiede zwischen AMAN und AIDP (TEKGUL et al., 2003), wohingegen vor allem AMAN bei Erwachsenen mit einer schlechteren Langzeitprognose behaftet ist (KORINTHENBERG, 2013; ELDAR & CHAPMAN, 2014). In der akuten Phase können die Patienten vor allem aufgrund einer autonomen Dysfunktion (Arrhythmie, Atemstillstand) oder einer unzureichenden Beatmung versterben (WILLISON et al., 2016). Bei bis zu 20 % der Patienten können auch nach Therapie anhaltende Behinderungen und damit verbundene Einschränkungen der Lebensqualität zurückbleiben, die sich in der Remission nur langsam, über Wochen und Monate, und oft unvollständig zurückbilden (REES et al., 1998; ELDAR & CHAPMAN, 2014; WILLISON et al., 2016). Mögliche Spätschäden sind Paresen, Beeinträchtigungen der Muskelreflexe, neuropathische Schmerzen und sensible Defizite (GESELLSCHAFT FÜR NEUROPÄDIATRIE et al., 2012). Diese äußern sich unter anderem in einer Unfähigkeit zu Rennen, nicht ohne Hilfe Laufen zu können, auf einen Rollstuhl angewiesen zu sein und/oder Beatmung zu benötigen (REES et al., 1998).

## **2 Tiermodelle für das GBS**

In diesem Kapitel werden insbesondere diejenigen Tiermodelle beschrieben, die im Hinblick auf feline und kanine IMPN bisherige Erkenntnisse verdeutlichen oder aber wichtige Unterschiede in Bezug auf eine Eignung als Tiermodell sichtbar machen. Zusätzlich erfolgt hier vor allem eine Berücksichtigung der Tiermodelle, die eine nähere Hinterleuchtung und Erforschung der ätiopathogenetischen Hintergründe des GBS zum Ziel hatten.

## **2.1 Tiermodelle für die AIDP**

### **2.1.1 EAN**

Das wohl gebräuchlichste Tiermodell für die AIDP ist die EAN (ZHANG et al., 2013), welche bei Ratten, Mäusen, Hühnern oder auch Affen induziert werden kann (LEHRICH & ARNASON, 1971; ZHANG et al., 2013). Vorteile dieses Modells für die Spezies Nager sind die breite Verfügbarkeit und Reproduzierbarkeit, das umfangreiche Wissen über genetische Einflüsse, ein breites Spektrum an speziesspezifischen Markern und Tools, die Möglichkeit der Generierung von Knock-Out-Modellen sowie die vordergründige Ähnlichkeit der endoneuralen Immunantwort zwischen Mensch und Nager (XIA et al., 2010; HIRSCHVOGEL, 2012). Wie in vielen anderen induktiven Experimentaltiermodellen reflektiert auch die EAN nicht die natürliche Entstehungsweise des GBS und damit Frühphase mit der zu Grunde liegenden molekularen Mimikry und ihren Einflüssen (RINALDI, 2013). Stattdessen werden bei der EAN definierte immunogene Auslöser injiziert, die bei dem GBS erst als sekundäre Zielstrukturen eine Rolle spielen. Die EAN kann durch eine aktive Immunisierung mit Myelinbestandteilen, wie den Myelinproteinen P0, P2, dem Myelin-assoziiertem Glykoprotein und PMP 22, in einer Kombination mit Freund's Adjuvans induziert werden (ABROMSON-LEEMAN et al., 1995; GABRIEL et al., 1998; WEERTH et al., 1999; SOLIVEN, 2012). Alternativ kann durch eine passive Immunisierung die Adoptiv-Transfer-Variante der EAN ausgelöst werden. Hier werden den Versuchstieren in vitro produzierte auto-aggressive T-Zellen gegen P2 und P0 verabreicht (ABROMSON-LEEMAN et al., 1995; HIRSCHVOGEL, 2012). Das pathophysiologische Bild der EAN ist gekennzeichnet durch eine defekte Blut-Nerven-Schranke, einer massiven Anhäufung von autoreaktiven T-Zellen und Makrophagen sowie einer Demyelinisierung (ZHANG et al., 2013).

### **2.1.2 Spontanes AIDP-Modell bei Hühnern: AvIDP**

Diese Ergebnisse wurden bestätigt und erweitert durch die Entdeckung der spontanen aviären inflammatorischen demyelinisierenden Polyradikuloneuropathie (AvIDP) bei weißen Leghorn-Hühnern (BADER et al., 2010). Es handelt sich um eine, in der Aufzuchtphase vorkommende, schlaffe

Lähmung, die sowohl vom Krankheitsverlauf als auch der Immunbiologie und Pathologie der humanen AIDP nahe steht (BADER et al., 2010). Auch hier wird vermutet, dass vorangehende Infektionen oder Impfungen durch die molekulare Mimikry an der Krankheitsentstehung beteiligt sind (HADDEN et al., 2001; SOUAYAH et al., 2007; BADER et al., 2010). Histopathologisch ist die AvIDP, wie auch die AIDP, gekennzeichnet durch eine Demyelinisierung mit endoneuraler Infiltration von Plasmazellen, Lymphozyten und Makrophagen (GRIFFIN et al., 1995; BADER et al., 2010). Die Lähmungsphase ähnelt dem fortgeschrittenen akuten Stadium der AIDP, mit dem hier stattfindenden TH-1 zu TH-2 Wechsel (BADER et al., 2010; ZHANG et al., 2013). Durch die natürliche Entstehung der AvIDP würde sich hier insbesondere die Erforschung der ätiopathogenetischen Faktoren im Tiermodell anbieten (BADER et al., 2010).

## **2.2 Tiermodelle für die AMAN**

Rund 20 Jahre prädominierte die T-Zell-medierte EAN als das Tiermodell die Erforschung des GBS (WILLISON et al., 2016). Erst nach einer histopathologischen Bestätigung der elektrodiagnostischen GBS-Subtypen kam auch die Frage nach weiteren Tiermodellen, besonders für die axonale Form, auf (GRIFFIN et al., 1995; HAFER-MACKO et al., 1996a; HAFER-MACKO et al., 1996b). Neuere Antikörper-medierte Tiermodelle lieferten wertvolle Erkenntnisse für eine Antikörper-medierte Immunattacke des Axolemma, unterhalten von einer molekularen Mimikry zwischen axolemmalen und mikrobiellen Oberflächenmolekülen (YUKI et al., 2001; SUSUKI et al., 2012; WILLISON, 2012; WILLISON et al., 2016).

### **2.2.1 Paralyse und Polyneuropathie in Hühnern nach *C. jejuni* Infektion**

#### **2.2.1.1 Spontane Variante**

Diese spontane paralytische Neuropathie wurde bei Hühnern im Bestand von an GBS erkrankten Farmern entdeckt (LI et al., 1996). Histopathologische Parallelen zur AMAN konnten hier bestätigt werden (LI et al., 1996). Die Veränderungen reichten von einem minimalen Ausprägungsgrad bis hin zu einer Wallerschen Degeneration, nodalen Erweiterungen und paranodalen

Demyelinisierungen (LI et al., 1996).

### **2.2.1.2 Experimentell-induzierte Variante**

Aufgrund der Entdeckung dieser spontanen GBS-ähnlichen Erkrankung bei Hühnern wurden weitere experimentelle Versuche durchgeführt, bei denen Hühner mit einem aus GBS-Patienten isolierten *C. jejuni* Stamm gefüttert wurden (LI et al., 1996; NYATI et al., 2012). Diese Form der Krankheitsinduktion basiert auf der molekularen Mimikry und ist damit vergleichbarer mit der natürlichen GBS-Entstehung als die EAN. Die Tiere entwickelten im Anschluss eine spontane Paralyse mit GBS-ähnlichen Ausfällen (LI et al., 1996; NYATI et al., 2012). Zugleich bestand bei den Hühnern in der spontanen und experimentellen Form ebenfalls eine periaxonale Makrophagenansammlung, wie sie auch schon bei den AMAN-Patienten beschrieben wurde (HAFER-MACKO et al., 1996a; LI et al., 1996). Zusätzlich zu der axonalen Variante wiesen die an der Studie beteiligten Hühner aber auch eine Demyelinisierung mit lymphozytärer Infiltration auf, wodurch sich das Hühnermodell vor allem für eine Untersuchung zwischen einem Zusammenhang von *C.jejuni* und der Entwicklung eines GBS eignet (NYATI et al., 2012).

### **2.2.2 AMAN-Modell in Kaninchen durch Sensibilisierung mit GM1**

Die Entdeckung dieses axonalen Tiermodells gründet auf dem Zusammenhang zwischen der therapeutischen Verabreichung von Rinderhirngangliosiden bei Menschen mit neurologischen Erkrankungen und der nachfolgenden Entwicklung einer AMAN (LANDI et al., 1993; ILLA et al., 1995; YUKI et al., 2001). Die Kaninchen entwickelten nach Injektion von Rinderhirngangliosiden eine akute, schlaffe Gliedmaßenlähmung mit monophasischem Verlauf (YUKI et al., 2001; SUSUKI et al., 2004). Histopathologisch zeigte sich vor allem eine Wallersche Degeneration, ohne Anzeichen einer Demyelinisierung oder einer Immunzellinvasion (YUKI et al., 2001). Dies ist vergleichbar mit histopathologischen AMAN-Befunden, bei denen ebenfalls eine Wallersche Degeneration dominiert, aber auch eine periaxonale Immunzellinvasion und paranodale Erweiterungen vorkommen können (GRIFFIN et al., 1995; HAFER-MACKO et al., 1996a). Gleichzeitig konnte, wie auch schon bei AMAN-Patienten nachgewiesen wurde, bei allen Kaninchen eine Titererhöhung von



Anti-GM1 festgestellt werden und es zeigten sich IgG-Ablagerungen auf den Axonen (HAFER-MACKO et al., 1996a; HADDEN et al., 1998; KUWABARA et al., 1998; YUKI et al., 2001). Da GM1 als Bestandteil der Axone bestätigt wurde und eine alleinige GM1-Injektion eine axonale Neuropathie hervorrufen konnte, lässt sich daraus schließen, dass GM1 der immunogene Trigger in der Mischung aus Rinderhirngangliosiden war (YUKI et al., 2001). Obwohl GM1 sowohl im peripheren Nervensystem (PNS) und im zentralen Nervensystem (ZNS) vorkommt löst eine Immunisierung mit diesem Antikörper nur eine periphere Neuropathie aus (SAIDA et al., 1979; YUKI et al., 2001). Eine Erklärung hierfür bietet die im Gegensatz zur Blut-Hirn Schranke weniger dichte Blut-Nerven Schranke (YUKI et al., 2001).

### **3 Kanine und feline Immunneuropathien**

#### **3.1 Kanine Immunneuropathien**

Als speziesnahe Spontanmodelle für das GBS sind besonders die kanine Coonhound Paralyse (CHP) und die akute kanine Polyradikuloneuritis (ACP) zu nennen (CUDDON, 2002).

##### **3.1.1 CHP**

Die durch Inokulation von Waschbärenspeichel im Hund hervorgerufene CHP stellt eine natürliche, sporadische AIDP-artige Krankheit dar, bei der pathologisch Entzündungszellinfiltrate in den ventralen Nervenwurzeln im Vordergrund stehen (CUMMINGS & HAAS, 1966; CUMMINGS & HAAS, 1972; CUMMINGS et al., 1982). Histologisch ist sowohl eine segmentale Demyelinisierung als auch eine axonale Degeneration zu sehen (CUMMINGS & HAAS, 1966; CUMMINGS et al., 1982). Das klinische Bild ähnelt dem des GBS, mit einer in den Hintergliedmaßen beginnenden, akuten, schlaffen Paralyse (CUMMINGS & HAAS, 1966). Elektromyografische (EMG) Befunde zeigen eine Denervation, gekennzeichnet durch Fibrillationspotentiale und positive scharfe Wellen sowie eine reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit (CUMMINGS & HAAS, 1966; CUMMINGS et al., 1982). Im Gegensatz zu GBS-Patienten zeigten die Hunde bei einer Liquorpunktion über die Cisterna cerebellomedullaris keine albuminozytologische Dissoziation, was aber auch

daran liegen kann, dass keine Lumbalpunktion erfolgt ist (CUMMINGS & HAAS, 1966). Ähnlich wie beim Menschen können protrahierte Krankheitsverläufe und eine unvollständige Remission vorkommen (CUMMINGS & HAAS, 1966). Betroffen sind Hunde aller Rassen. Eine genetische Prädisposition ist nicht bekannt, jedoch gibt es interindividuelle Unterschiede in der Empfänglichkeit, die der experimentellen Nutzung der CHP für die GBS-Forschung entgegensteht (CUMMINGS et al., 1982).

### **3.1.2 ACP**

Als weitere AIDP-konforme Spontanerkrankung wurde das Krankheitsbild der ACP immunbiologisch dem GBS zugeordnet (RUPP et al., 2013). Die ACP ist eine sporadisch auftretende, rasseunabhängige Erkrankung beiderlei Geschlechts, die als eine der Hauptursachen akuter schlaffer Lähmungen des Hundes einzustufen ist (CUDDON, 1998; HOLT et al., 2011; HIRSCHVOGEL et al., 2012; RUPP et al., 2013; ANOR, 2014). Wichtig ist hier die Differenzierung zu chronischen immun-medierten Polyneuropathien mit akutem Krankheitsbeginn (aCIMPV), die sich in Bezug auf die klinischen und elektrodiagnostischen Befunde ähnlich wie die ACP darstellen können, in der histopathologischen Untersuchung aber klar zu unterscheiden sind (MOLIN et al., 2011). Vergleichbar zum GBS findet sich bei der ACP eine Ventralwurzelprädominanz mit einem, nach distal abnehmenden Schädigungsgradienten, entsprechenden elektrodiagnostischen Befunden und einer isolierten Proteinerhöhung im CSF (CUMMINGS et al., 1982; CUDDON, 2002). Ihr wird ebenfalls eine Exposition zu immunogenen Triggern unterstellt, die bislang nicht identifiziert werden konnten (CUDDON, 2002).

#### **3.1.2.1 Immunbiologie**

Erste histologische Untersuchungen hatten der ACP bereits vor längerer Zeit einen GBS-konformen Schädigungsmodus attestiert und als AIDP-ähnliche Spontanerkrankung eingestuft (CUMMINGS & HAAS, 1966; CUMMINGS & HAAS, 1972; NORTHINGTON & BROWN, 1982). Ätiologische Faktoren sind, wie auch beim GBS, vorangehende Impfungen (hier vor allem Tollwut) und Infektionen des Respirations- und Gastrointestinaltraktes (CHETBOUL, 1989; GEHRING & EGGARS, 2001; CUDDON, 2002). Bei Hunden kommt auch

*Toxoplasma gondii* als potentieller Trigger in Betracht (HOLT et al., 2011). Durch die molekulare Mimikry erfolgt eine Umleitung der humoralen/zellulären Immunantwort auf Protein- oder Lipidkomponenten der peripheren Nervenfasern (COOK & DOWLING, 1981; CUDDON, 2002). Wie auch der AIDP wird der ACP eine zellulär-medierte Immunreaktion zugeschrieben, bei der initial aktivierte T-Zellen durch die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  für einen Zusammenbruch der Blut Nerven Schranke verantwortlich sein sollen (CUDDON, 2002). Dies führt im Weiteren zu einer gesteigerten Durchlässigkeit für Entzündungsmediatoren, Ig und vor allem für CTL und TH. Durch eine Interaktion zwischen TH und antigenpräsentierenden Zellen werden AGA, Anti-Glykolipid- und Anti-Myelin-Antikörper durch klonale B-Zellproliferation gebildet (CUDDON, 2002). Die GBS-Forschung hat sich die letzten Jahre vermehrt die Aufklärung der Rolle von Antikörpern an der Ätiopathogenese, vor allem im Hinblick auf die AMAN und durch die Entdeckung von AGKA auch bei der AIDP, zum Ziel gesetzt. Diese Aussage wurde nun auch durch den Nachweis zirkulierender Anti-GM2-AGA im Blut betroffener Hunde bestätigt und präzisiert (RUPP et al., 2013). GM2 gehört zu den Gangliosiden, einer Gruppe von Membranmolekülen, die auch als eine der Hauptzielstrukturen der Immunreaktion beim GBS fungieren. Überprüft werden muss außerdem, ob außer Anti-GM2-AGA noch weitere AGA vorkommen und AGKA bei der ACP eine Rolle spielen. Immunhistochemische Untersuchungen von NFZ eignen sich hier besonders gut für eine genauere Charakterisierung der vorhandenen Autoantikörper sowie deren Lokalisation am peripheren Nerven. Auch eine Phänotypisierung der beteiligten Immunzellen kann auf diese Weise erfolgen.

### **3.1.2.2 Histologie**

Neben axonaler Degeneration kommen segmentale und paranodale Demyelinisierungen vor sowie eine stadienspezifische Infiltration von Entzündungszellen (CUDDON, 2002). Am stärksten betroffen sind die ventralen Nervenwurzeln und die hiervon abgehenden spinalen Nerven (CUDDON, 2002). In einem geringeren Ausmaß betroffen sind die dorsalen Nervenwurzeln und die peripheren Nerven (CUDDON, 2002).

### **3.1.2.3 Klinische Symptome**

Klinisch zeigen die erkrankten Hunde 7-14 Tage nach vorangehender Auseinandersetzung mit einem immunogenen Trigger einen steifen, gestelzten und in der Schrittlänge verkürzten Gang, der sich im Verlauf, meist in den Hintergliedmaßen beginnend, zu einer schlaffen Tetraparese/-plegie weiterentwickelt (CUDDON, 2002; ANOR, 2014). Die neurologische Untersuchung zeigt eine generalisierte Hypotonie/Atonie und eine Hyporeflexie/Areflexie (CUDDON, 2002; ANOR, 2014). Zusätzlich und in unterschiedlicher Weise ausgeprägt können Hyperästhesien, neurogene Muskelatrophien und eine Beeinträchtigung der kranialen Nerven vorkommen, die sich vor allem durch eine Fazialisparese/-paralyse und Dysphonien bemerkbar macht (CUDDON, 2002; STANCIU & SOLCAN, 2016). Das Bewusstsein der betroffenen Hunde zeigt wie auch beim GBS keine Einschränkungen (CUDDON, 2002). Eine weitere Gemeinsamkeit sind die meist erhaltenen autonomen Funktionen, wie willentlicher Kot- und Urinabsatz sowie die Futter- und Wasseraufnahme (CUDDON, 2002).

### **3.1.2.4 Diagnose**

Die Herausforderung in der Diagnosestellung beruht hier auf dem Ausschluss der drei Hauptdifferentialdiagnosen Botulismus, Myasthenia gravis oder der durch Zecken verursachten Paralyse (COLEMAN, 1998; CUDDON, 2001, 2002; ANOR, 2014). Für die Diagnosestellung wichtig sind daher die klinische Präsentation, die Untersuchung von CSF sowie die elektrodiagnostische Untersuchung und die Evaluation von Muskel- und Nervenbiopsien (CUDDON, 2002; SEJVAR et al., 2011a; ANOR, 2014). Auch sollten alle 1-2 Wochen vor Beginn der Erkrankung stattgefundenen Ereignisse, wie Impfungen und Infektionen, anamnestisch abgeklärt werden (CUDDON, 2002). Wie auch schon bei der CHP beschrieben, zeigt die Analyse des cisternal gewonnenen CSF im Gegensatz zu dem aus einer Lumbalpunktion gewonnenen CSF keine Proteinerhöhung (CUMMINGS & HAAS, 1966; CUDDON, 2002). Im Vergleich zum GBS entwickeln sich die klinischen und elektrodiagnostischen Abnormalitäten bei Hunden mit ACP in einem kürzeren Zeitraum (CUDDON, 1998).

EMG Untersuchungen weisen Fibrillationspotentiale und positive scharfe

Wellen auf (CUDDON, 1998). Weitere Abnormalitäten der elektrodiagnostischen Untersuchung beinhalten eine erhöhte F-Ratio, eine verlängerte F-Wellen-Latenz, das Fehlen von F-Wellen, eine F-Wellen-Amplitudenminderung, eine erniedrigte CMAP und eine temporale Dispersion (NORTHINGTON & BROWN, 1982; CUDDON, 1994, 1998, 2002; ANOR, 2014). Die hier beschriebenen Befunde zeigen in erster Linie eine motorische Axonopathie an, aber es ist nicht auszuschließen, dass Anzeichen für eine Demyelinisierung nur überdeckt werden (CUDDON, 1998). Im Gegensatz zu den Parametern, die für eine Axonopathie sprechen, konnten die Parameter (v. a. verlängerte distale motorische Latenz, erhöhte temporale Dispersion und verlängerte F-Wellen Latenz), die für eine Demyelinisierung sprechen nicht konstant in allen untersuchten Nerven nachgewiesen werden (CUDDON, 1998). Der sowohl bei der AIDP als auch bei der AMAN vorkommende klassische Leitungsblock wurde bei Hunden mit ACP nur selten festgestellt (CUDDON, 1998). Die Nervenleitgeschwindigkeit, als Kriterium für eine Demyelinisierung, ist meist unverändert (CUDDON, 1998). Die elektrodiagnostischen Untersuchungsbefunde zeigen somit sowohl eine Axonopathie (v.a. durch die Verringerung der CMAP) an aber auch Hinweise auf Demyelinisierung (v.a. in den ventralen Nervenwurzeln) wie eine erhöhte F-Ratio und verlängerte F-Wellen-Latenz sind vorhanden (NORTHINGTON & BROWN, 1982; CUDDON, 1994, 1998, 2002). In neueren Studien aus den letzten Jahren wurde wiederum eher eine demyelinisierende ACP diagnostiziert (RUPP et al., 2013; STANCIU et al., 2014).

Biomarker für die ACP-Routinediagnostik sind bis jetzt nicht verfügbar. Jedoch wurde durch die Detektion von Anti-GM2-AGA durch Glykoarrays der Weg für neue diagnostische Möglichkeiten geebnet (RUPP et al., 2013). Mit einer Sensitivität von 60 % und einer Spezifität von 97 % sind dies durchaus erfolgsversprechende Aussichten (RUPP et al., 2013). Auch die immunhistochemische Untersuchung von NFZ kann künftig über eine Identifikation und Lokalisation der AGA/AGKA wertvolle Beiträge für die diagnostische Aufarbeitung leisten.

### **3.1.2.5 Therapie**

Bei Hunden erfolgt in erster Linie eine symptomatische Therapie mit

Physiotherapie, Infusion bei Dehydratation und Beatmung bei respiratorischen Problemen (CUDDON, 2002). Zusätzlich kommt auch noch eine Therapie mit IVIg in Frage, die in einer Pilotstudie bei Hunden mit ACP zu einer schnelleren Genesung führte (CUDDON, 2002; DOUGLAS & WINER, 2006; HIRSCHVOGEL et al., 2012; ANOR, 2014). Kortikosteroide haben keinen vorteiligen Effekt und sollten nicht verwendet werden (CUDDON, 2002; HIRSCHVOGEL et al., 2012). Die meisten Hunde erholen sich in einem Zeitraum zwischen 4-6 Monaten vollständig, aber wie auch schon beim GBS erwähnt, können je nach Schweregrad der Erkrankung neurologische Defizite zurückbleiben (CUDDON, 2002; STANCIU et al., 2014). Die Sterblichkeitsrate aufgrund von Atemstillstand oder Pneumonie wird auf bis zu 12 % beziffert (HIRSCHVOGEL et al., 2012; RUPP et al., 2013).

### **3.2 Feline Immuneuropathien**

Berichte zu akuten IMPN bei Katzen sind im Vergleich zu Hunden rar (STANCIU et al., 2014) und stehen damit im Gegensatz zu der außerordentlich hohen Prävalenz bei reinrassigen Jungkatzen (GRANGER et al., 2008; MATIASSEK et al., 2009; JEANDEL et al., 2015). Ebenso wie beim Hund sind aber auch hier akute schlaffe Tetraparesen/-paralysen beschrieben, die vergleichbar mit dem GBS sind (LANE & DE LAHUNTA, 1984; GERRITSEN et al., 1996; CHRISMAN, 2000; GRANGER et al., 2008). Immunbiologische Daten zu feline IMPN sind nur lückenhaft dokumentiert bzw. bislang unzureichend untersucht (BENSFIELD et al., 2011; VOLK et al., 2011).

#### **3.2.1 Histologie**

Histopathologische Untersuchungen sind seltener als bei der CHP/ACP. Beschrieben werden hier sowohl minimale pathologische Veränderungen sowie eine axonale Degeneration als auch eine Demyelinisierung mit Makrophagen- und Lymphozytenakkumulation in den ventralen Nervenwurzeln und peripheren Nerven (LANE & DE LAHUNTA, 1984; GERRITSEN et al., 1996; JEANDEL et al., 2015). Zu untersuchen ist hier, ob ebenso wie beim Menschen unterschiedliche Subtypen existieren.

### **3.2.2 Klinische Symptome**

Ebenso wie bei CHP, ACP und GBS handelt es sich hier um eine akute, schlaffe, zumeist in den Hintergliedmaßen beginnende und sich rasch zu einer Tetraparese/-plegie weiterentwickelnde Erkrankung (GERRITSEN et al., 1996; CHRISMAN, 2000; VOLK et al., 2011). Im Vergleich zu Hunden, bei denen keine Altersprädominanz festgestellt wurde, tritt die Erkrankung bei Katzen meist im Alter von drei Monaten bis vier Jahren auf (CHRISMAN, 2000). Während die Sensibilität erhalten ist, sind die Spinalreflexe reduziert oder abwesend (GERRITSEN et al., 1996; CHRISMAN, 2000; GRANGER et al., 2008).

### **3.2.3 Diagnose**

Die Diagnose basiert vor allem auf den klinischen Symptomen und den elektrodiagnostischen Untersuchungen (GRANGER et al., 2008).

Differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden müssen eine infektiöse Polyneuritis, eine durch Intoxikation bedingte Polyneuropathie und Polymyopathien (GRANGER et al., 2008).

Elektrodiagnostische Untersuchungen zeigten Fibrillationspotentiale, positive scharfe Wellen, eine verminderte CMAP Amplitude, eine erhöhte temporale Dispersion, Leitungsblöcke sowie eine erhöhte F-Ratio und verlängerte F-Wellen-Latenz (GRANGER et al., 2008; JEANDEL et al., 2015). Die Befunde weisen wie auch schon bei der ACP und bei der AMAN auf eine axonale Neuropathie hin (GRANGER et al., 2008). Für eine Muskel- und Nervenbiopsieentnahme kann eine elektrodiagnostische Untersuchung entscheidende Hinweise für die Lokalisation der Entnahmestellen geben (GRANGER et al., 2008).

Nervenbiopsien können wertvolle Informationen im Hinblick auf eine Beteiligung von Entzündungszellen, axonale Degeneration oder Demyelinisierung/Remyelinisierung liefern (FREEMAN et al., 2009). Immunhistochemische Untersuchungen von NFZ bieten hier die Möglichkeit, die beteiligten humoralen/zellulären Akteure zu identifizieren und so wertvolle Beiträge zum Verständnis der Ätiopathogenese zu liefern, als auch eine Einschätzung der Prognose und das weitere therapeutische Vorgehen zu

erleichtern. Zusätzlich kann eine CSF-Analyse eine albuminozytologische Dissoziation anzeigen (VOLK et al., 2011).

### **3.2.4 Therapie**

Bei Katzen ist die Therapie auf unterstützende Maßnahmen wie Physiotherapie, weiche Lagerung und Hilfe bei der Futter-/Wasseraufnahme beschränkt (ANOR, 2014). Die Atmung kann ebenfalls beeinträchtigt sein, sodass eine Sauerstofftherapie oder Beatmung durchgeführt werden muss (CHRISMAN, 2000). Von der größten untersuchten Studiengruppe, bestehend aus neun Katzen, sind sieben Katzen ohne medikamentöse Therapie in einem Zeitraum von vier bis sechs Wochen komplett genesen (GERRITSEN et al., 1996). Zwei der Katzen mussten hingegen aufgrund respiratorischer Probleme euthanasiert werden (GERRITSEN et al., 1996). Konträr zur ACP und zum GBS gibt es Beschreibungen, dass Kortikosteroide die Remission/Genesung positiv beeinflussen (LANE & DE LAHUNTA, 1984; MALIK et al., 1991; CHRISMAN, 2000).



### III      TEILSTUDIE 1: IMMUN-MEDIIERTE POLYNEUROPATHIEN – SUBTYPISIERUNG

#### **Nodo-paranodopathy, internodopathy and cleftopathy: Target-based reclassification of Guillain-Barré-like immune-mediated polyradiculoneuropathies in dogs and cats**

Simone Gross<sup>a</sup>, Andrea Fischer<sup>b</sup>, Marco Rosati<sup>a</sup>, Lara Matiassek<sup>c</sup>, Daniele Corlazzoli<sup>d</sup>, Rodolfo Cappello<sup>e</sup>, Laura Porcarelli<sup>d</sup>, Tom Harcourt-Brown<sup>f</sup>, Konrad Jurina<sup>b</sup>, Laurent Garosi<sup>g</sup>, Thomas Flegel<sup>h</sup>, Pia Quitt<sup>b</sup>, Jessica Molin<sup>a</sup>, Velia-Isabel Huelsmeyer<sup>b</sup>, Henning Schenk<sup>i</sup>, Gualtiero Gandini<sup>j</sup>, Kirsten Gnirs<sup>k</sup>, Stéphane Blot<sup>l</sup>, Aurélien Jeandel<sup>l</sup>, Massimo Baroni<sup>m</sup>, Shenja Loderstedt<sup>n</sup>, Gianluca Abbiati<sup>o</sup>, Carola Leithaeuser<sup>p</sup>, Sabine Schulze<sup>q</sup>, Marion Kornberg<sup>r</sup>, Mark Lowrie<sup>s</sup>, Kaspar Matiassek<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Section of Clinical & Comparative Neuropathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

<sup>b</sup>Section of Neurology, Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Munich, Germany

<sup>c</sup>Neurology Referral Service, Tierklinik Haar, Haar, Germany

<sup>d</sup>Clinica Veterinaria Roma Sud, Rome, Italy

<sup>e</sup>North Downs Specialist Referrals, Bletchingley, Surrey, United Kingdom

<sup>f</sup>Section of Neurology, Langford Veterinary Services, University of Bristol, Bristol, United Kingdom

<sup>g</sup>Neurology Referral Service, Davies Veterinary Specialists, Manor Farm Business Park, Higham Gobion, United Kingdom

<sup>h</sup>Neurology Unit, Department of Small Animal Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

<sup>i</sup>Neurology Service, Tierklinik Lueneburg, Lueneburg, Germany

<sup>j</sup>Department of Veterinary Medical Science, University of Bologna, Italy

<sup>k</sup>Section of Neurology & Neurosurgery, Advetia Clinic for Small Animal Medicine, Paris, France

<sup>l</sup>Section of Neurologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, University of Paris Est, Maisons Alfort, France

<sup>m</sup>Section of Neurology, Clinica Veterinaria Valdinievole, Monsummano, Italy

<sup>n</sup>Section of Neurology, Clinic of Small Animal Medicine, University of Berlin, Berlin, Germany

<sup>o</sup> Clinica Veterinaria Malpensa, Samarate, Italy

<sup>p</sup> Small Animal Clinic Magunna-Magunna-Nickel, Norderstedt, Germany

<sup>q</sup> Small Animal Clinic Fuerstenwalde, Germany

<sup>r</sup> Small Animal Clinic Trier, Germany

<sup>s</sup> Dovecote Veterinary Hospital, Castle Donington, United Kingdom

*Parts of this Work were presented at the 28<sup>th</sup> Annual Symposium of ESVN and ECVN, Amsterdam 2015*

Submitted to Neuromuscular Disorders, Official Journal of the World Muscle Society; Received 15 March 2016, recieved in revised form 14 July 2016; accepted 29 August 2016; published online 1 September 2016.

doi: 10.1016/j.nmd.2016.08.015

**Abstract**

Recent views on Guillain-Barré syndrome (GBS) question the accuracy of classification into axonal and demyelinating subtypes that represent convergent neurophysiological phenotypes rather than immunological targets. Instead it has been proposed to clarify the primarily affected fiber subunit in nerve biopsies. As nerve biopsies rarely are part of routine work-up in human patients we evaluated tissues taken from companion animals affected by GBS-like polyradiculoneuropathy to screen for distribution of immune cells, targeted fiber components and segregating non-inflammatory lesions. We identified that immune responses were directed either at Schmidt-Lanterman clefts, the paranode-node complex or both. Based on infiltrative and non-inflammatory changes, four subtypes and/or stages were distinguished, some of which indicate localisation of primary target antigens while others represent convergent late stage pictures, as a consequence to epitope spreading. The impact of histological subtyping onto clinical management and prognosis remains to be evaluated in future clinical trials. Natural development and clinical manifestation of large animal dysimmune neuropathy may reflect human Guillain-Barré syndrome more accurately than experimental models and therefore provide complementary clues for translational research.

## 1. Introduction

Guillain-Barré Syndrome (GBS)-like neuropathy resembles the most common cause of sporadic acute non-traumatic limb paralysis amongst citizens of developed countries [1]. Similar syndromes are seen in dogs and cats in which they comprise important differentials to infectious polyradiculoneuritis, tick paralysis, fulminant myasthenia gravis, snake envenomation and botulism [2-6].

To avoid confusion by different terms and acronyms used for individual species (e.g. GBS, Acute Canine Polyradiculoneuritis (ACP)), the term Immune-mediated Polyradiculoneuropathy (IMPN) has been used in this manuscript when referring to the group of dysimmune neuropathies.

IMPN in people [7], dogs [2, 8] and cats, have all been hypothesized to originate from redirected immune response addressing myelin components or axolemmal antigens [9]. While Coonhound Polyradiculoneuritis in dogs can be reproduced by inoculation of raccoon saliva, the molecular mimicry responsible for sporadic IMPN in dogs, cats and humans is assumed to result from antigen challenges in the course of infection, vaccination and exposure to environmental pathogens [2, 10].

Once the immune reaction has been redirected to nerve fibers, IMPN in people are diagnosed and characterized by their clinical course, pattern of neurological impairment, albuminocytologic dissociation on CSF analysis and electrodiagnostic abnormalities, while nerve biopsies are not part of standard algorithms [11]. Even though not considered relevant for its clinical diagnosis, lack of insights into pathomorphological characteristics may render the understanding of GBS aetiopathogenesis and prediction of clinical course incomplete [12]. For its revelation and conclusions on disease progression it may be essential to have a closer look onto topography and distribution of fiber lesions and their segregation with cellular and humoral effector mechanisms in vivo. Currently, IMPN classification only aims to discriminate axonal and demyelinating subtypes via electrophysiology as axonal neuropathies should be associated with less favorable prognosis [12].

The most common electrophysiological GBS-variant is Acute Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy (AIDP) [13, 14]. AIDP is characterized

by axons stripped free of myelin by macrophages [15, 16]. This, however, does not rule out secondary axonal degeneration [17] resulting from lack of neurotrophic Schwann cell factors at advanced stages. Quite the opposite has been proposed for its axonal counterpart Acute Motor Axonal Neuropathy (AMAN). It is represented by immune attack of the nodes of Ranvier, leaving the myelin sheath initially unaffected. Demyelination however may kick-in at later stages [15, 16]. Because of this convergence and equivocal electrodiagnostic features, distinction of axonal and demyelinating GBS variants, in particular at advanced stages, is difficult to achieve without nerve biopsy [13]. The same appears to be true for ACP [18]. As in GBS, serological evidence of anti-ganglioside antibodies often does not provide a clue as to whether the underlying disease is axonal or demyelinating [8]. In this regard, comparative data from biopsies of IMPN-affected animals should add to our understanding.

First analogies of veterinary cases and GBS have been recognized in Coonhound Polyradiculoneuritis [2, 19, 20]. These similarities later on were reproduced in other immune-mediated canine polyradiculoneuritides without preceding raccoon contact and with successful application of similar treatments as in people [21], summarized as ACP [2, 21, 22].

Similar to GBS, ACP exhibits ventral root predominance with distally decreasing gradient of functional and electrodiagnostic impairment (muscle spontaneous activity, decreased compound muscle action potential (CMAP) amplitudes and increased minimum F-wave latencies or absent F-waves, increased F-ratios, decreased F-wave amplitudes) as well as with protein increase in cerebrospinal fluid (CSF) with albuminocytologic dissociation [2, 20].

Dysimmune neuropathies of yet unclear cause (idiopathic) and less stereotypic clinical presentation also have been reported in cats [3, 23-27]. The rather sparse literature on feline immune-mediated neuropathies, however, states features similar to ACP [3, 25, 28, 29] albeit their resemblance to GBS remained to be clarified.

Insights from nerve biopsies in IMPN-affected dogs and cats imply some recurrent patterns that allow for subclassification of clinically indistinguishable patients in support of Uncini et al. 2013 [12]. Whether morphological subtypes might be associated with different courses and outcomes remains to be clarified.

In order to base this assumption on scientific grounds, we reevaluated IMPN biopsies by screening for consistent damage patterns and addressed the pathomorphology with regards to the reported clinical history.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Case selection

Nerve biopsies of a two-year period were screened for evidence of mononuclear nerve fiber invasion. Biopsies underwent nerve fiber processing as described below. Only cases that (1) exhibited infiltration of pre-degenerate fibers and (2) that lacked histopathological, serological and polymerase chain reaction (PCR) indications of neurotropic infection (e.g. *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*) and systemic vasculitis were included.

### 2.2. Nerve processing

Nerve fascicles were freed from epineurial/mesoneurial tissue, gently separated from each other and fixed in 2.5 % glutaraldehyde for 1-2 hours. Thereafter, they were rinsed with and immersed in 0.1 M Soerensen's phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.2 M buffered D (+)-saccharose until further processing. Four segments of 2 mm length were harvested from proximal and distal edges using a razor blade. They were postfixed for 2 hours in 2 % osmium tetroxide followed by repeated buffer rinses and ascending alcohol series ensued by embedding in epoxy resin (Glycidether 100, Serva®, Heidelberg, Germany) [30]. Semithin sections (0.5 µm) were mounted on standard slides and stained with Richardson staining [31] modified by Wieczorek [30]. Osmificated intermediate parts of the fascicle, measuring approximately 8 mm in length, were subjected to nerve fiber teasing (NFT) with and without counterstaining by hematoxylin (Mayer's Hemalaun, Merck, Germany). NFT was performed after stepwise incubation in 70 %-100 % glycerol, using a dissection microscope (Olympus SZH, Zeiss Stemi DV4, Oberkochen, Germany). At least 100 osmium tetroxide stained fibers containing  $\geq 3$  internodes each were prepared for evaluation [32-34]. In addition, at least 20 hematoxylin counterstained fiber clusters with a minimum length of 3 internodes were collected per nerve for better depiction of endoneurial cells. All teased fibers were mounted on poly-l-lysine-coated glass slides (SuperFrost®Plus-slides, Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany),

embedded in 100 % glycerol and sealed with xylene-based cover medium (Histokitt®, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim/Röhn, Germany) as evaporation barrier.

### *2.3. Morphological algorithms*

Nerve specimens were investigated by two independent raters, experienced in peripheral nerve pathology, via brightfield microscopy using a Zeiss Axiophot® (Zeiss Instruments, Oberkochen, Germany). Semithin sections were used to specify abnormalities of epineurium, perineurium, endoneurial blood vessels and interstitial tissue, myelinated nerve fiber density and distribution, myelin thickness and compaction, preservation of paranodes and Schmidt-Lanterman clefts (SLC), Schwann cell morphology, axonal diameters and axoplasmic contents. NFT samples further allowed for assessment of longitudinal characteristics such as internodal length and spatial distribution patterns of pathological lesions, the specific morphology of paranodes and juxtaparanodes as well as the width of the nodal gaps. Abnormalities were recorded for each single nerve fiber using semiquantitative scores implementing lesion intensity and number and distribution of affected segments. Reproducibility of scores was ascertained by randomly repeated sample evaluation by blinded raters.

Standard fiber schemes were used to clarify topography (nodal, paranodal, juxtaparanodal, internodal, SLC), distribution (focal, oligofocal, multifocal, diffuse) and possible segregation of inflammatory and non-infiltrative lesions, as well as the invasivity of infiltrating cells (adherent, invasive) and the number and proportion of affected fibers.

### *2.4. Data analysis*

The prevalence of nerve fiber lesions was established for all included cases. Thereby, severity and distribution of specific lesion types were recorded and implemented into a formula to acquire an overall value for nerve fiber affection per nerve sample and IMPN subgroup. Occurrence and segregation of inflammatory and non-infiltrative changes were compared in between the identified IMPN subtypes using Fischer's exact test. P values  $\leq 0.05$  were accepted as indicating significance.

### 2.5. *Retrospective analysis of clinical records*

Apart from data on the individual clinical history including type, course and onset of clinical signs, electrophysiology, diagnostic imaging, laboratory testing and preceding therapy response, further details on the case were requested using questionnaires. Cases only were included if these questionnaires were completed and returned.

Questionnaire 1 specifically requested details on the pedigree, food, health/vaccination and exposure history, results of neurological tests and concurrent medical problems. Questionnaire 2 was dedicated to the interpretation of nerve conduction studies (NCS) and electromyography (EMG) by board-certified neurologists (*European College of Veterinary Neurology* and/or *American College of Veterinary Internal Medicine (Neurology)*) with regards to demyelinating, axonal and mixed features (NCS) as well as indications for muscle denervation (EMG) [35].



### 3. Results

#### 3.1. Patient demographics & biopsy sites

For the given period, 23 % of all nerve biopsies submitted for histological analysis presented with fibre-invasive inflammatory changes. Of this group, nineteen canine cases met the inclusion criteria comprising 11 pure bred dogs, 7 cross breeds and 1 mongrel. According to a scheme modified from *Agility Regulations of the Federation Cynologique International* [36] 8 pure bred dogs resembled large breeds (43-65 cm height at the withers), 1 a middle-sized (36-43 cm) dog and 2 small breed dogs (<35 cm). The age ranged between 1.8 and 14.0 years (median 6.3 years). Five dogs were female, eight male, two male-neutered, and four female spayed.

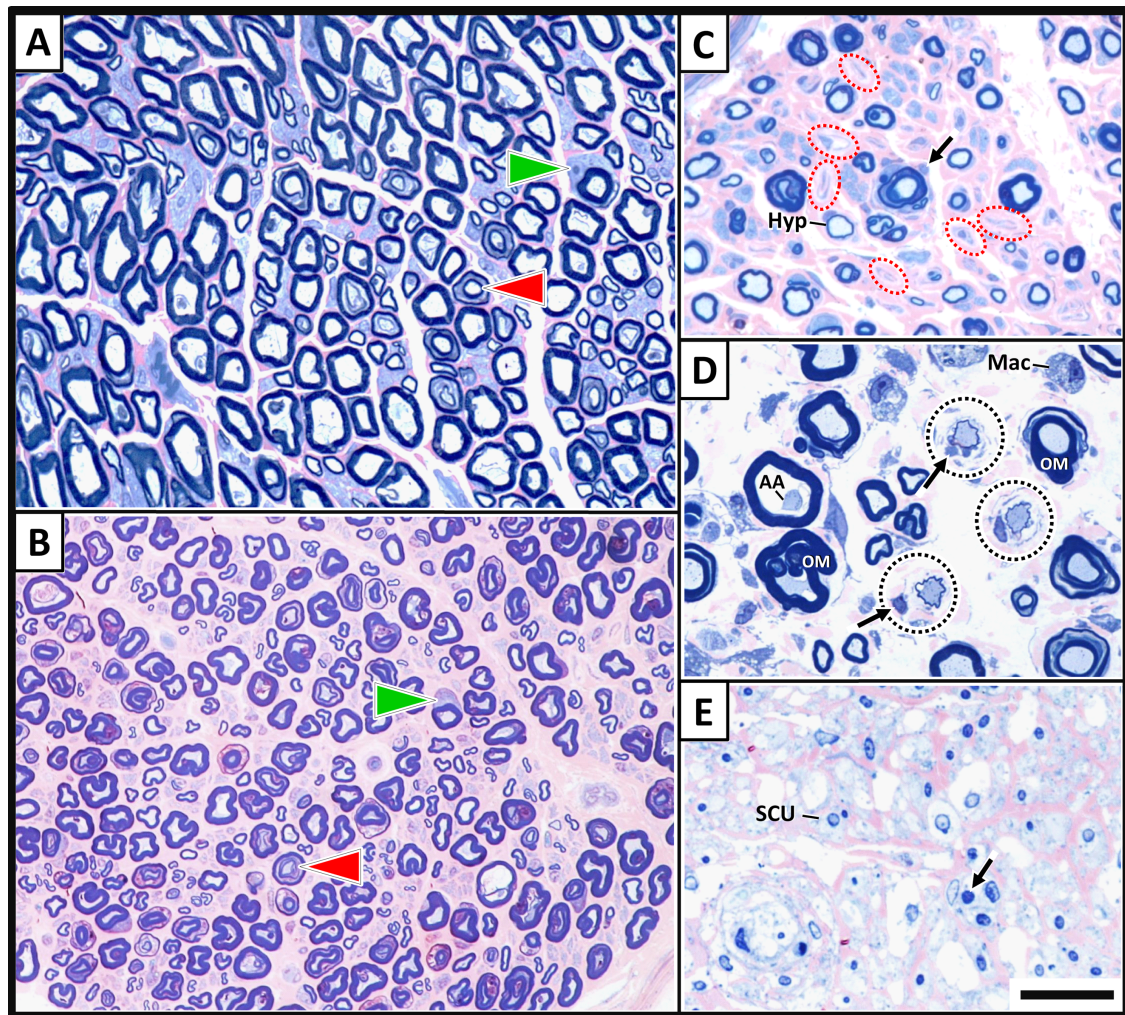
As much as 59 % of feline nerve biopsies submitted for diagnostic evaluation were consistent with IMPN. Availability of material rendered 15 cats appropriate for inclusion in the study comprising 4 British shorthair (BSH), 3 Bengal cats, 2 Birman cats, 2 domestic longhair cats, 2 domestic shorthair cats, 1 Abyssinian and 1 Carthusian. Median age at sampling was 1.7 years (range 0.4–9.0 years). Gender distribution was six males, three females, one female spayed, and five male-neutered.

Biopsies were taken from common peroneal nerve (12 biopsies each in dogs and cats), tibial nerve (3 dogs/ 3 cats), ulnar nerve (3 dogs/1cat) and radial nerve (1 dog).

#### 3.2. Peripheral nerve histology and scoring

##### 3.2.1 General patterns of inflammation

Extended examination of nerve fibers confirmed previous diagnosis of a fiber-directed lympho-histiocytic neuritis that inconsistently could be seen on semithin slides but was clearly evident on teased nerve fibres (Fig. 1).



**Fig. 1.** Semithin histology examples of IMPN in cats (A, D, E) and dogs (B and C).

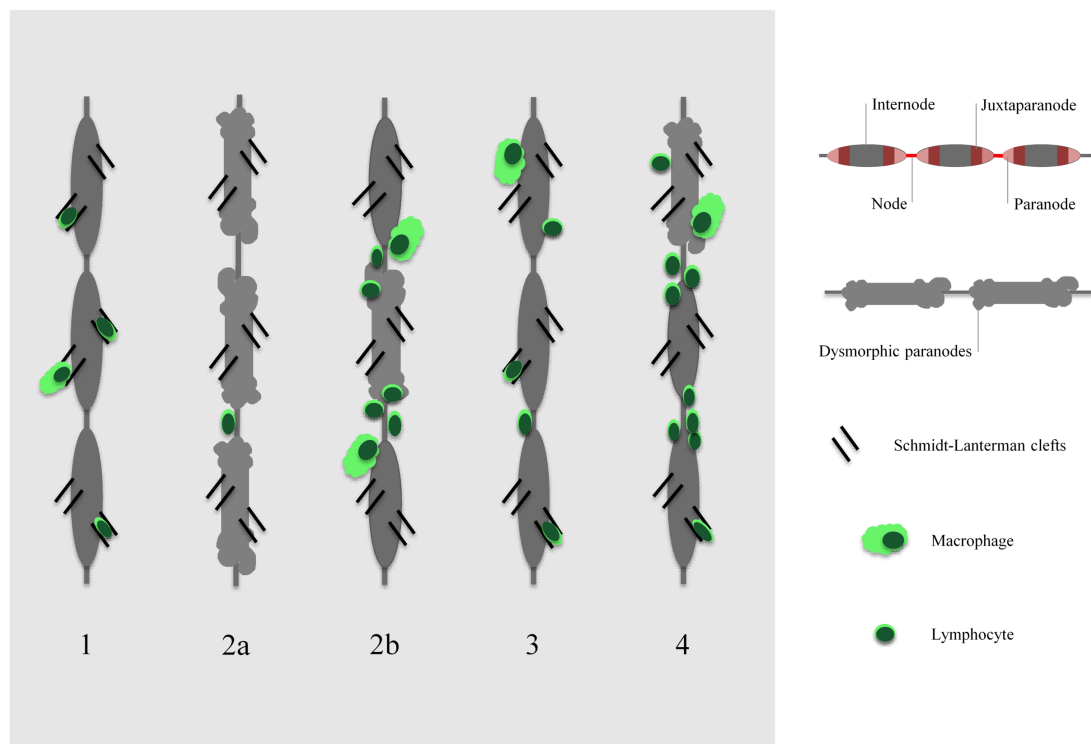
In a majority of acutely presenting cases semithin sections show minimal alterations only (A and B), such as mild non-specific Schwann cell hypertrophy (green arrowheads) and a generalized loss of fiber circularity (B). Schmidt-Lanterman clefts comprise a normal feature (red arrowheads), enlargement of which only can be reliably assessed in NFT.

Internodopathies/cleftopathies (C) are more prominent on slides than NPN subtypes (D) due to their longitudinal dispersion. Apart from fiber adherent/invasive mononuclear cells (arrow), demyelinated (red dotted frames) and hypomyelinated fibers (hyp) may be seen.

In NPN subtypes (D) the de/remyelinated paranodes rarely are featured in transverse sections on which paranodal and intermodal affection cannot be distinguished. Affected fibers of similar size typically are clustered at a similar section level (black dotted frames) and may show invading lymphocytes (arrow). Extrafocal lesions may give rise to axonal atrophy (AA) followed by myelin outfolding (OM). Activated macrophages (Mac) characterize the resorptive and post-resorptive stages.

After fulminant demyelination (E) the inflammatory character of the disorder appears to abolish with loss of target antigens. Sections show demyelinated Schwann cell units (SCU). After extensive destruction and digestion the role of sparse residual lymphocytes (arrow) cannot be reliably judged. Scale bar: 50  $\mu$ m (A and C); 70  $\mu$ m (B); 30  $\mu$ m (D and E)

Different panels of spatial infiltration patterns became evident on longitudinal fiber examination, with preferential involvement of SLC or preferential involvement of nodes and paranodes (NPN) or both. These subtypes could not reliably distinguished on semithin sections, as a series of at least three sequential internodes and four paranode-node regions per fiber were considered necessary to provide reliable data on substructure-specific affection. The different invasion types, subtypes and stages are illustrated in Figure 2.



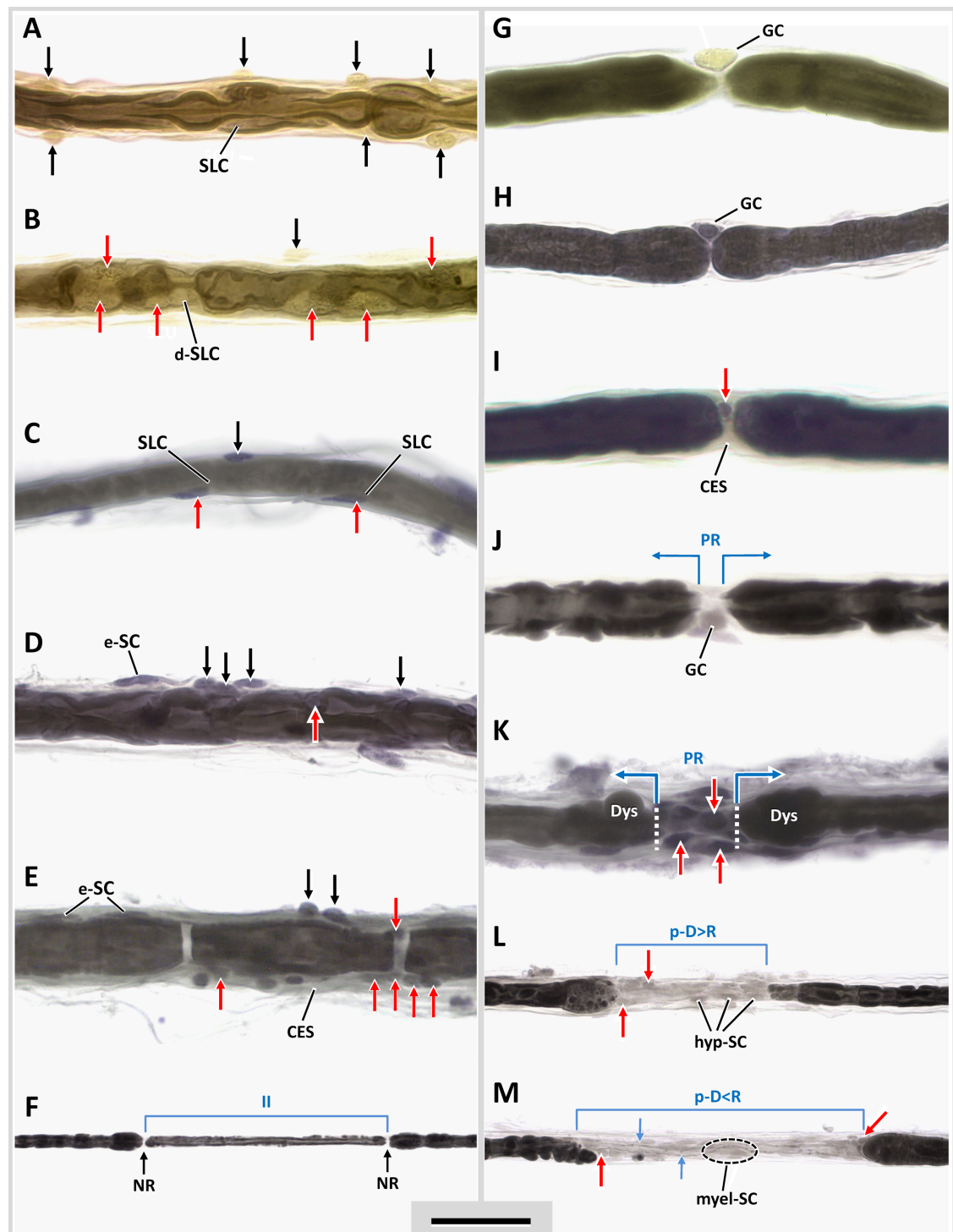
**Fig. 2.** Schematic illustration of IMPN subtypes.

- (1) In IMPN subtype 1 cells are attached or enter the Schmidt-Lanterman clefts.
- (2a) Early invasive IMPN subtype 2 with marked demyelination, dysmorphic paranodes, paranodal retraction and only few cells located at the node of Ranvier.
- (2b) Infiltrative IMPN subtype 2 with cell-clusters in the area of the node of Ranvier.
- (3) IMPN subtype 3 with an overall cell distribution.
- (4) Mixed IMPN subtype 4 with NPN predominance.

In short, pure SLC (subtype 1) and NPN types (early infiltrative 2a subtype, late infiltrative 2b subtype) could be distinguished from a mixed type (subtype 3) and mixed-type with NPN predominance (subtype 4).

Subtype 1 showed inflammatory cells spread along stereotypic internodal segment. Most of the immune cells either were attached to the Schwann cell lip overlying the SLC or had invaded the SLC (Fig. 3 A-F). In subtype 2, immune cells targeted NPN, beginning at the nodal gap and in more advanced stages attaching to retracted and often dysmorphic paranodes (Fig. 3 G-M). Based on the stages and degree of cellular invasion as well as the evidence of pre-infiltrative paranodal retraction an early subtype 2a, exhibiting only few gap cells, was distinguished from the more cellular late subtype 2b. The third IMPN subtype refers to an equal affection of SLC and NPN segments within the same fibers. In subtype 4 there was a severe NPN invasion accompanied by a milder involvement of the SLC.





**Fig. 3.** Typical teased fiber features with SLC (A-F) and NPN (G-M) affection.

The role of lymphohistiocytic infiltrates (black arrow) cannot be judged unless they conclusively attach to the fiber surface (A and C) overlying the Schmidt-Lanterman clefts (SLC) or invade the latter (red arrowheads, B, C, D). In this case the SLC may appear dilated (d-SLC, B). At advanced stages (D and E), adherent (black arrows) and infiltrating cells (red arrows) disperse over the surface and there is a proliferation of endoneurial spindle cells (e-SC), comprising Schwann cells and endoneurial fibroblasts. Moreover, proliferation of the collagenous endoneurial sheath (CES, E) starts to surround the individual fibers as translucent halo. Partial recovery is characterized by remyelinating intercalating internodes (II, F).

In early nodo-paranodopathy (G and H) there is an abundance of nodal gap cells (GC) attaching to pre-degenerate fibers, a few of which can be seen in normal fibers during immune surveillance. Invasion into the nodal space (I: red arrow; J: GC) with paranodal retraction (PR) is a conclusive sign of a specific immune event. During destabilization paranodes become dysmorphic (K: Dys) showing bulging and protrusions. Invading immunocytes (K, L, M: red arrows) synchronously are seen in between sequential internodes. Affected paranodes show demyelination (p-D>R) with various degrees of Schwann cell hyperplasia (hyp-SC) amongst proliferation of undetermined endoneurial spindle cells as well as remyelination (p-D<R) after engraftment of a main myelinating Schwann cell (myel-SC; black dotted frame) amidst the segment delineated by nodes and hemi-nodes.

Scale bar: 30  $\mu\text{m}$  (A-E, G-K); 75  $\mu\text{m}$  (F); 45  $\mu\text{m}$  (L and M)

### 3.2.2 Distribution of inflammatory patterns amongst IMPN affected dogs and cats

In affected canids the majority of patients presented with subtype 2 (9/19; 47 %) 4 animals of which showed type 2a features and 5 dogs subtype 2b stages, followed by subtype 1 in 37 % (7/19) and 3 animals (3/19; 16 %) with equally mixed pattern (type 3). Subtype 4 features were not evident in this species. Instead, mixed subtype 4 was most common in the feline cohort (7/15; 47%), followed by subtype 3 (5/15; 33 %), subtype 1 (2/15; 13 %) and one single case of IMPN subtype 2b. Due to only advanced stages seen in these cats, none of the biopsies matched with early infiltrative subtype 2a.

### 3.2.3 Segregation of inflammatory and non-inflammatory lesions

Fiber pathologies (Table 1) associated with SLC invasion, in both species, were non-specific ( $p > 0.05$ ) and comprised in particular enlargement of SLC, disruption of the myelin spiral and cell-mediated myelin stripping. Respective changes were observed in 6 out of 7 subtype 1 dogs (86 %) and both subtype 1 affected cats (2/2; 100 %). In 3/7 canine samples (43 %), demyelination extended over the entire internodes and gave rise to (multi)segmental demyelination. In two of these dogs, multiple hypomyelinated intercalating internodes suggested active remyelination.

Subtype 2a ( $p < 0.0001$ ) and subtype 2b ( $p = 0.0002$ ) IMPN in dogs and subtype 4 in cats ( $p = 0.006$ ) significantly were associated with paranodal retraction and, hence, widening of the nodal gap. Nodoparanodopathies further presented with a high frequency of Phillips type I paranodes [37], paranodal dysmorphism and

demyelination that either preceded (subtype 2a) or accompanied (subtypes 4 > 2b > 3) immune cell invasion. In detail, 2a and 2b subtype dogs exhibited paranodal retraction in 3/4 (75 %) versus 5/5 (100 %) of cases. Abundant Phillips type 1 paranodes were seen in 1/4 (24 %) of the 2a affected dogs and in 3/5 (60 %) of 2b cases. Three out of 4 dogs with 2a subtype (75 %) revealed paranodal dysmorphism ( $p=0.006$ ). The same was seen in 2/5 (40 %) dogs with subtype 2b ( $p=0.004$ ). Axonal features were just seen in late stage subtype 2b in 2/5 dogs (40 %).

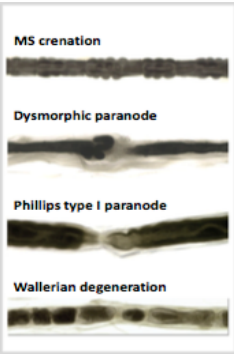
In the single subtype 2b affected cat, teasing preparations again revealed paranodal retraction, dysmorphic paranodes and paranodal demyelination and remyelination. The nerve also exhibited widening of the SLC. Axonal changes were missing.

Consistent with SLC involvement in subtype 3, their enlargement was seen in 2/3 (67 %) dogs and 5/5 (100 %) cats. All the dogs also presented with dysmorphic paranodes ( $p=0.0004$ ), while paranodal retraction and demyelination affected some fibers in one dog only. This contrasts to the majority of feline subtype 3 cases that significantly were affected by paranodal demyelination ( $p=0.001$ ) and subsignificantly presented with dysmorphic paranodes ( $p=0.22$ ) and paranodal retraction ( $p=0.08$ ). Segmental features of demyelination were not evident in the feline subtype.

Only cats presented with subtype 4 IMPN. Consistent with the predominance of a paranodal immunogenic target, paranodal demyelination/remyelination was the most prominent feature in 6/7 (86 %) cats ( $p<0.0001$ ). They further significantly displayed dysmorphic paranodes (6/7; 86 %;  $p=0.04$ ) and paranodal retraction (5/7; 71 %;  $p=0.04$ ). In contrast to pure nodoparanodopathy, the SLC in subtype 4 were significantly enlarged ( $p<0.0001$ ). More advanced cases showed segmental demyelination (2/7; 29 %) and Wallerian degeneration (1/7; 14 %). Main features of SLC and NPN affection are illustrated in Figure 2.

**Table 1.**

Non-infiltrative fiber lesions associated with IMPN subtypes.

IMPN		Subtype 1		Subtype 2a		Subtype 2b		Subtype 3		Subtype 4	
Species		dog	cat	dog	cat	dog	cat	dog	cat	dog	cat
n		7	2	4	0	5	1	3	5	0	7
<b>Nerve fibre pathology</b>  	Myelin sheath crenation	n 4	1	4	0	2	1	1	3	0	7
		n/tf 0.29	0.5	0.4	0	0.29	1.00	0.04	0.31	0	0.64
	SLC widening	n 6	2	4	0	5	1	2	5	0	4
		n/tf 0.65	0.85	0.71	0	0.73	1.00	0.62	0.78	0	0.40
	Retracted paranodes	n 3	0	3	0	5	1	1	3	0	5
		n/tf 0.16	0.00	0.47	0	0.43	0.31	0.06	0.11	0	0.10
	Dysmorphic paranodes	n 4	1	3	0	2	1	3	3	0	6
		n/tf 0.09	0.06	0.25	0	0.24	0.23	0.33	0.16	0	0.27
	De-/Remyelinated paranodes	n 2	0	0	0	1	1	1	3	0	6
		n/tf 0.09	0.00	0.00	0	0.01	0.23	0.27	0.22	0	0.39
	Phillips type 1 paranodes	n 2	0	1	0	3	0	1	0	0	0
		n/tf 0.07	0.00	0.02	0	0.03	0.00	0.04	0.00	0	0.00
	Intercalating internodes	n 2	0	2	0	1	0	0	0	0	0
		n/tf 0.02	0.00	0.08	0	0.01	0.00	0.00	0.00	0	0.00
	De-/remyelinated segments	n 3	0	1	0	1	0	1	0	0	2
		n/tf 0.08	0.00	0.02	0	0.02	0.00	0.27	0.00	0	0.04
	Wallerian de-generation	n 0	0	0	0	2	0	2	0	0	1
		n/tf 0.00	0.00	0.00	0	0.07	0.00	0.10	0.00	0	0.01

n: number of affected animals per subtype; nf/t: average of affected nerve fibers/total number of nerve fibers per slide

### 3.2.4 Yield of infiltration and fiber pathologies within the nerve biopsies

Throughout IMPN subtypes in dogs, 30 %-100 % of teased fibers showed cellular infiltrates (Table 2). Infiltration was least evident in canine subtype 2a (mean  $42.1 \pm 16.2$  %) and most striking in subtype 3 (100 % throughout). The range of invaded fibers was similar in cats (39-100 %) with an overall occurrence of  $84.5 \pm 17.3$  % (Table 3). In contrast to dogs, subtype predominance could not be demonstrated in cats.

Non-infiltrative lesions were encountered in all nerve fibers of subtype 2 affected dogs throughout. The frequency was insignificantly lower in canine subtype 3 ( $95.6 \pm 7.70$  % affected fibers) and 1 ( $83.7 \pm 24.0$  %). In cats, all IMPN subtypes likewise presented with morphological abnormalities in  $95.8 \pm 8.8$  % of teased myelinated fibers.



**Table 2.**

Yield of non-inflammatory and inflammatory features in individual canine IMPN nerves.

<b>Dogs</b>		
<b>IMPN / animal no.</b>	<b>Affected fibres %</b>	
	<b>non-inflammatory lesions</b>	<b>inflammatory lesions</b>
<b>Subtype 1</b>		
<b>1</b>	89.5 %	83.3 %
<b>2</b>	94.7 %	58.8 %
<b>3</b>	100 %	78.6 %
<b>4</b>	37.5 %	62.5 %
<b>5</b>	100 %	33.3 %
<b>6</b>	100 %	80 %
<b>7</b>	64.3 %	42.9 %
<b>Subtype 2a</b>		
<b>8</b>	100 %	65 %
<b>9</b>	100 %	30 %
<b>10</b>	100 %	42.1 %
<b>11</b>	100 %	31.3 %
<b>Subtype 2b</b>		
<b>12</b>	100 %	87.5 %
<b>13</b>	100 %	46.2 %
<b>14</b>	100 %	81.3 %
<b>15</b>	100 %	65 %
<b>16</b>	100 %	68.4 %
<b>Subtype 3</b>		
<b>17</b>	100 %	100 %
<b>18</b>	86.7 %	100 %
<b>19</b>	100 %	100 %

**Table 3.**

Yield of non-inflammatory and non-inflammatory features in individual feline IMPN nerves.

<b>Cats</b>		
<b>IMPN / animal no.</b>	<b>Affected fibres %</b>	
	<b>non-inflammatory lesions</b>	<b>inflammatory lesions</b>
<b>Subtype 1</b>		
<b>1</b>	92.3 %	90.9 %
<b>2</b>	100 %	94.4 %
<b>Subtype 2b</b>		
<b>3</b>	100 %	63.6 %
<b>Subtype 3</b>		
<b>4</b>	100 %	100 %
<b>5</b>	100 %	91.7 %
<b>6</b>	100 %	100 %
<b>7</b>	90.9 %	39.3 %
<b>8</b>	66.7 %	70 %
<b>Subtype 4</b>		
<b>9</b>	100 %	87.5 %
<b>10</b>	95 %	92.3 %
<b>11</b>	100 %	90.5 %
<b>12</b>	100 %	100 %
<b>13</b>	100 %	95 %
<b>14</b>	91.7 %	87.5 %
<b>15</b>	100 %	65 %

### 3.3. Case history and clinical presentation

#### 3.3.1 History and neurological presentation

Pedigree data did not reveal familial clustering or inheritance. Likewise, food and exposure anamnesis were non-contributory. One dog had been suffering from enteritis one week prior to onset of neurological signs. Another dog and two cats were vaccinated within six weeks before onset of clinical signs. Notably, in one cat relapse of neurological deficits was associated with vaccination.

Onset of canine IMPN was mostly sudden (15/19; 79 %) and occasionally insidious (4/19; 21 %). On admission, five dogs with tetraparesis (5/19; 26 %) were non-ambulatory. Another two dogs (2/19; 11 %) were tetraplegic. The twelve remaining dogs were ambulatory, exhibiting tetraparesis (8/19; 42 %), unilateral or bilateral forelimb paresis (1/19 each; 5 %), paraparesis of the hindlimbs (1/19; 5 %) and one dog was referred because of unilateral hindlimb lameness (1/19; 5 %).

Spinal reflexes could not be elicited in one dog. In the other 18 dogs, spinal reflexes were reduced. They comprised reduced withdrawal (9/19; 47 %), patellar tendon (2/19; 11 %), cranial tibial (1/19; 5 %) and extensor carpi radialis reflex (1/19; 5 %). The distribution and localization of reflex abnormalities with regards to the biopsy site is illustrated in supplementary figure 1. Three dogs exhibited paw placing deficits. Cranial nerve deficits were seen in 4/19 (44 %) dogs in terms of abnormal menace response (2/19; 11 %), reduced palpebral reflex (1/19; 5 %), facial paresis (1/19; 5 %) and laryngeal paralysis (1/19; 5 %). One dog presented with recrudescence pain.

Similar to dogs, disease onset was sudden in most affected cats (11/15; 73 %). In 3/15 (20 %) cats an insidious onset of reluctance to walk and postural and/or gait abnormalities were reported. No reliable information on onset of clinical signs was available for one cat. On admission, 6/15 (40 %) cats were tetraparetic and non-ambulatory. Ambulatory cats either were tetraparetic (4/15; 27 %), paraparetic (4/15; 27 %) or considered easily fatiguable (1/15; 7 %).

Decreased spinal reflexes were documented in all 15 cats (Table 4). Most cats showed reduced withdrawal reflexes in all four limbs (10/15; 67 %), followed by

depressed patellar tendon reflex (8/15; 53 %), reduced tibialis cranialis reflex (4/15; 27 %) and absent withdrawal in either forelimbs (1/15; 7 %) or hindlimbs (1/15; 7 %). No spinal reflex could be evoked in one single cat (1/15; 7%). Deficits in paw placing were noted in four cats (4/15; 27 %). One cat each exhibited dysaesthesia and hyperaesthesia, in pelvic limbs and tail. Another cat showed reduced skin sensation. Cranial nerve involvement was documented in four cats, comprising nystagmus (1/15; 7 %), facial paresis (1/15; 7 %), reduced menace response (1/15; 7 %) and reduced palpebral reflex (1/15; 7 %). For further details see supplementary figure 2.

### 3.3.2 *Electrodiagnostic features*

Electrodiagnostic investigations (Table 4) were reported from 16 of the 19 dogs. Thereby, nerve conduction studies (NCS) revealed mixed signs of demyelination and axonal disease together with muscle denervation in seven dogs (7/16; 48 %). Purely axonal features and electromyographic evidence of muscle denervation (fibrillation potentials, positive sharp waves (PSW)) were seen in five (5/16; 31 %) dogs. Three dogs (3/16; 19 %) showed NCS consistent with demyelination plus fibrillation potentials on EMG. Demyelinating features without EMG changes were reported in one dog (1/16; 6 %).

Amongst 14 tested cats that underwent electrodiagnostics, 5 (5/14; 36 %) displayed a combination of axonal and demyelinating NCS features and an EMG denervation pattern (Table 4). Axonal NCS changes and fibrillation potentials/PSW were recorded from six cats (6/14; 43 %). Only one cat (1/14; 7 %) displayed demyelinating features without abnormal muscle activity. Fibrillation potentials and PSW without NCS changes were recognized in two cats (2/14; 14 %).

**Table 4.**

Neurological presentation and electrodiagnostic interpretation with regards to IMPN subtypes in dogs and cats.

IMPN	Subtype 1		Subtype 2a		Subtype 2b		Subtype 3		Subtype 4	
	dog	cat	dog	cat	dog	cat	dog	cat	dog	cat
<b>Number animals per IMPN type</b>	7	2	4	0	5	1	3	5	0	7
<b>Spinal reflex abnormalities</b>	6	2	4	0	5	1	3	5	0	7
<b>Sensory dysfunction</b>	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1
<b>CN involvement</b>	1	0	1	0	2	0	0	1	0	3
<b>NCS</b>	No data available	2	1	-	-	-	1	-	-	-
	Demyelinating	2	0	0	0	2	0	0	1	0
	Axonal	2	1	2	0	1	1	0	1	0
	Mixed	1	0	2	0	2	0	2	2	0
<b>EMG</b>	No data available	2	1	-	-	-	1	-	-	-
	Denervation features	5	1	4	0	4	1	2	4	0

CN: cranial nerve; NCS: nerve conduction studies; EMG: electromyography

### 3.3.3 *Medication history*

Ten dogs and five cats were treated with anti-inflammatory treatments prior to biopsy surgery. Eight dogs received immunosuppressive doses of glucocorticoids with (2/8; 25 %) or without (6/8; 75 %) non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Two dogs were treated with NSAIDs only. Only two dogs receiving glucocorticoids showed initial improvement with early relapse. NSAIDs did not result in clinical amelioration. Two cats were treated with glucocorticoids and three received NSAIDs. Initial improvement with relapse was seen in one cat on glucocorticoids and one cat treated with NSAIDs. In another cat, clinical signs resolved permanently after monotherapy with NSAIDs.

#### 4. Discussion

Complex immune-mediated disorders that arise through exposure to environmental pathogens and infective agents cannot be easily simulated in animal experiments. The high prevalence of canine and feline IMPN in veterinary practice may offer comparative and complementary insights into disease mechanisms and control and renders them interesting for GBS research.

In this retrospective screen as much as 23 % of canine and 59 % of feline nerve biopsies submitted by veterinary neurologists were consistent with IMPN. Still, IMPN are underdiagnosed in clinical practice. This is due to inadequate diagnostic procedures, spontaneous remission, or subtle infiltrates that may not present on nerve sections. Moreover, in acute tetraplegia the dramatic presentation all too often drives sensitive pet owners and veterinary practitioners prematurely to elect euthanasia rather than proceeding to advanced diagnostic modalities.

Like GBS patients, IMPN affected dogs and cats most commonly are admitted due to acute-onset paraparesis progressing rapidly to non-ambulatory LMN tetraparesis or tetraplegia [1, 2, 21, 38]. Due to species-related differences in locomotion and stance, feline IMPN cases may present at more advanced stages [38] compared to dogs, which impacts on the panel of features to be seen in peripheral nerve biopsies.

For clinical GBS diagnosis in people the following criteria have been considered compulsory: 1) progressive weakness in more than one extremity with maximum duration of four weeks, 2) loss of at least one myotactic reflex, and 3) exclusion of other etiologies by (not further specified) “appropriate” methods [39]. Supportive criteria comprise symmetric paresis, mild sensory symptoms, cranial nerve deficits, 1-4 weeks plateau phase followed by recovery, autonomic dysregulation, albuminocytologic dissociation on CSF analysis, GBS-compatible electrodiagnostic findings, absence of fever at clinical onset, and seropositivity for autoantibodies in AMAN, Miller-Fisher syndrome and the pharyngocervicobrachial variant of GBS [39]. Even though only latter parameters provide direct evidence of an autoimmune disease, clinical consensus algorithms do not implement nerve biopsies.

Diagnostic determinants of IMPN in dogs and cats are less well defined. Recommendations emphasize neurological examination, electrodiagnostic testing and CSF analysis [2, 25, 38]. Currently, the speed of onset and progression to tetraplegia together with rapidly evolving widespread spontaneous electric activity, delayed or absent F waves and decreased CMAP amplitudes with or without dispersion appear most characteristic and help to narrow down differentials [6, 18, 21].

Confirmative biomarkers currently are either lacking (cats) or hold reliable for a subset of cases only and require validation in a larger cohort of patients - such as serological testing for autoantibodies (dogs) [8]. This is one major reason for veterinary neurologists to proceed to nerve biopsies. Biopsy studies if performed by a specialist indeed appear most feasible to achieve the definite diagnosis of an inflammatory neuropathy and to provide the morphological substrate of neurological and electrophysiological dysfunction [6].

As biopsy sites for avoidance of procedure-related morbidity most commonly involve the distal trunk of superficial sensory nerves, their diagnostic yield for diagnosis of a multifocal and predominantly proximal motor nerve disease could be questioned [5, 40]. The sensitivity of a nerve biopsy, on the other hand, can be significantly enhanced by teased fiber studies. Thereby, polychromatic teasing preparations, as used herein are particularly helpful to pick up disseminated inflammatory infiltrates and to identify specific targets of an immune attack.

At least 30 % of myelinated fibers in IMPN affected dogs and 40 % in cats, that way, allowed for IMPN subtyping; meaning that the overall recommendation of investigating a minimum of 3 internodes of 100 teased fibers [41] is sufficient to establish a specific diagnosis. Unfortunately, only a paucity of diagnostic laboratories performs NFT. Instead, they base their diagnoses on random sections in which projected axonal features dominate over disseminated fiber lesions and targeted fiber units cannot be identified with certainty.

First histological reports on canine IMPN date back as far as 1966 [42]. Ever since then, canine IMPN has been perceived as GBS model [19, 20, 42]. Further similarities to human disorders were identified in Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy (CIDP [43, 44] and IMPN associated with breed-



related neuropathy [26].

As target antigens may differ amongst clinically uniform disorders [8] the authors reevaluated IMPN biopsies with regards to the spatial characteristics of immune cell invasion and associated fiber changes. Thereby, this study supports recent claims to base the classification of autoimmune neuropathy on the affected functional fiber subunits [12], which might not comply with electrophysiological diagnosis of an axonal versus demyelinating disorder [45].

Due to this discrepancy, it was suggested to refer to AMAN and other anti-ganglioside antibody associated subtypes as nodoparanodopathy [12]. It underlines the primary injury location and implicates the involved structures and location-specific molecular targets [12]. Canine and feline cases further add internodopathies and in particular those involving SLC (cleftopathy) to the pathomorphological IMPN panel. Thereby, pure subtypes (subtype 1 and subtype 2) were more commonly seen in dogs while in feline nerves affection of multiple subunits (subtypes 3 and 4) predominated. This variable involvement of myelin sheath components and axolemma may lead to conflicting electrophysiological features, in particular as it may change with the stage of disease and treatment.

Controversial electrophysiological findings thus are common in GBS patients [45] and IMPN affected dogs and cats. For example, AMAN typically has been associated with reduced distal CMAP amplitude [12, 46]. On the other hand, AMAN patients with anti-GM1 antibodies frequently show nerve conduction block without temporal dispersion that would be indicative for demyelinating neuropathy [12, 47]. The conduction block is thought to be caused by antibodies neutralizing ion currents of the NPN area leading to reversible conduction failure (RCF). RCF requires distinction from demyelinative conduction block by lack of slow components plus rapid recovery on serial electrodiagnostic testing [12].

Hence, with a single investigation only, correct classification of GBS case is very difficult to achieve [12, 45]. Exactly the same problem arises in dogs and cats. In particular, primary demyelinating IMPN with secondary axonal changes is prone to be confused with primary axonal disease. Consequently, ACP has been reported as an AMAN-like acute motor axonopathy, in which signs of demyelination may be masked [18]. Other state that ACP may be a

demyelinating disorder resembling AIDP [8]. This exactly was the case in one feline and two canine patients of this study that presented with significant paranodal, internodal or mixed demyelination.

On the contrary, RCF appeared to mimic demyelinating disease in two dogs prediagnosed with nodoparanodopathy in absence of demyelination. Again sequential NCS are required to allow for proper interpretation of the seemingly demyelinating features. Even though not yet substantiated by immunohistochemistry, the sparsely invasive subtype 2a may be initially evoked by autoantibodies similar to AMAN in rabbits, which is induced by GM1 injection [12, 48]. Comparable to human and leporine AMAN [12, 49], retraction of paranodes in IMPN subtypes 2a/b in dogs and 2b and 4 in cats may result from complement activation and membrane attack complex formation [12, 48].

Any attempt to associate IMPN immunopathology to a certain aetiopathogenesis requires consideration of both the predominantly lesioned neural subunit and the association of immune cells versus humoral factors with the respective subunit at pre-degenerate stage.

Compatible to GBS, IMPN in animals result from molecular mimicry [7] that upon stimulation by an external immunogen redirects the immune response towards endogenous epitopes. The assailed structures express proteins or glycolipids as part of myelin sheath or axonal membrane [50] and depending on which structure is affected it conducts to development of the different IMPN subtypes.

Hitherto identified GBS-causing agents on the other hand may incite either AMAN or AIDP. For example *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) triggers anti-GM1 dependent AMAN in young patients, while in others, without circulating antibodies, electrophysiology proved consistent with AIDP [51]. Thus, the biology and neurophysiological consequences of an immune reaction caused by a certain agent is influenced by intrinsic host factors that often cannot be predicted clinically [51]. Further stratification with regards to differences in the immunobiology and required treatments could benefit essentially by an advanced morphological subclassification as proposed herein. This type of investigation also clarifies stage specific features and expansion of target antigens. For example mixed IMPN may either result from immune reaction against bifocal tissue antigens [52] or it may converge from long standing pure

subtypes, in which additional antigens may be exposed and presented in the due course of the disease.

This appears to be the case in particular during IMPN subtype 2 to 4 shifting. Similar to human nodo-paranodopathies, pre-infiltrative stages of subtype 2 in dogs suggest an initial involvement of humoral immune mechanisms [12]. Later on, macrophages and yet undefined lymphocytes are recruited to assist paranodal detachment (subtype 2b). This concept remains to be proven by screens for tissue bound antibodies and complement factors in cryosections or paraformaldehyde treated nerve tissue in future. Moreover, longitudinal screens for circulating anti-ganglioside antibodies may obtain stage-specific patterns with regards to the sequence of target antigens [8].

Predominance of subtype 3 and 4 in cats and the occurrence of all subtypes in breed-related feline IMPN in this study indicate confluence into a mixed pattern at advanced stages. Overrepresentation of “B-type cats” (British shorthair, Birman, Bengal) [25, 26] in absence of Mendelian traits suggest an involvement of immune response genes, like major histocompatibility complex (MHC) haplotypes, as seen in IMPN of other species [53] and in other immune-mediated disorders [54-56]. In contrast to the feline counterpart, IMPN in dogs rarely presents in young animals and a breed predisposition has not been reported [8].

The primary target of an immune attack has proven to influence likelihood and degree of remission or recovery. In particular axonal involvement goes with prolonged reconvalescence and long-term impairment [12]. As axonal NCS features turned out not to be strictly associated to axon degeneration and poor outcome, which, on the other hand, cannot be excluded without biopsy, early treatment should be considered in all IMPN cases unless follow-up data are available for specific subtypes.

In summary, application of the morphological classification scheme for canine and feline IMPN could assist to further clarify the functional targets, clinical consequences, etiopathogenesis and efficacy of tailored therapies in upcoming prospective studies. This way, large animal studies may provide a valuable addendum to data obtained from non-natural GBS in experimental animals.

**Abbreviations**

ACP	Acute Canine Polyradiculoneuritis
AIDP	Acute Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy
AMAN	Acute Motor Axonal Neuropathy
CIDP	Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CMAP	compound muscle action potential
CSF	cerebrospinal fluid
GBS	Guillain-Barré syndrome
IMP	Immune-mediated polyradiculoneuropathy
LMN	lower motor neuron
MHC	major histocompatibility complex
NCS	nerve conduction studies
NFT	nerve fiber teasing
NPN	nodes of Ranvier and paranodes
NSAIDS	non-steroidal anti-inflammatory drugs
PSW	positive sharp waves
RCF	reversible conduction failure
SLC	Schmidt-Lanterman clefts
Subtype 1	Schmidt-Lanterman cleft subtype
Subtype 2a	early infiltrative NPN subtype
Subtype 2b	infiltrative NPN subtype
Subtype 3	mixed subtype
Subtype 4	mixed subtype with NPN accentuation

## References

- [1] Lunn MPT, Willison HJ. Diagnosis and treatment in inflammatory neuropathies. *Postgraduate Medical Journal* 2009;85:437-446.
- [2] Cuddon PA. Acquired canine peripheral neuropathies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2002;32:207-49.
- [3] Gerritsen RJ, van Nes JJ, van Niel MH, van den Ingh TS, Wijnberg ID. Acute idiopathic polyneuropathy in nine cats. *The Veterinary quarterly* 1996;18:63-5.
- [4] Coleman ES. Clostridial neurotoxins: Tetanus and botulism. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1998;20:1089-1096.
- [5] de Lahunta A, Glass E, *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*. Third Edition ed. 2009: Saunders, W. B.
- [6] Anor S. Acute lower motor neuron tetraparesis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2014;44:1201-22.
- [7] Shahrizaila N, Yuki N. Guillain-barre syndrome animal model: the first proof of molecular mimicry in human autoimmune disorder. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011;2011:829129.
- [8] Rupp A, Galban-Horcajo F, Bianchi E, et al. Anti-GM2 ganglioside antibodies are a biomarker for acute canine polyradiculoneuritis. *J Peripher Nerv Syst* 2013;18:75-88.
- [9] Zhang HL, Zheng XY, Zhu J. Th1/Th2/Th17/Treg cytokines in Guillain-Barre syndrome and experimental autoimmune neuritis. *Cytokine & growth factor reviews* 2013;24:443-53.
- [10] Sejvar JJ, Baughman AL, Wise M, Morgan OW. Population incidence of Guillain-Barre syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology* 2011;36:123-33.
- [11] Eldar AH, Chapman J. Guillain Barre syndrome and other immune mediated neuropathies: diagnosis and classification. *Autoimmunity reviews* 2014;13:525-30.
- [12] Uncini A, Susuki K, Yuki N. Nodoparaneuropathy: beyond the demyelinating and axonal classification in anti-ganglioside antibody-mediated neuropathies. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 2013;124:1928-34.
- [13] Uncini A, Yuki N. Electrophysiologic and immunopathologic correlates in Guillain-Barre syndrome subtypes. *Expert Rev Neurother* 2009;9:869-84.
- [14] Hadden RD, Cornblath DR, Hughes RA, et al. Electrophysiological classification of Guillain-Barre syndrome: clinical associations and outcome. *Plasma Exchange/Sandoglobulin Guillain-Barre Syndrome Trial Group. Annals of neurology* 1998;44:780-8.
- [15] Hughes RAC, Cornblath DR. Guillain-Barré syndrome. *The Lancet* 2005;366:1653-1666.

- [16] Dimachkie MM, Barohn RJ. Guillain-Barre syndrome and variants. *Neurologic clinics* 2013;31:491-510.
- [17] Rajabally YA, Durand MC, Mitchell J, Orlikowski D, Nicolas G. Electrophysiological diagnosis of Guillain-Barre syndrome subtype: could a single study suffice? *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2015;86:115-9.
- [18] Cuddon PA. Electrophysiologic assessment of acute polyradiculoneuropathy in dogs: comparison with Guillain-Barre syndrome in people. *J Vet Intern Med* 1998;12:294-303.
- [19] Cummings JF, Haas DC. Animal model for human disease: Idiopathic polyneuritis, Guillain-Barré Syndrome. Animal model: Coonhound paralysis, idiopathic polyradiculoneuritis of coonhounds. *Am J Pathol*. 1972;66:189-192.
- [20] Cummings JF, de Lahunta A, Holmes DF, Schultz RD. Coonhound paralysis. Further clinical studies and electron microscopic observations. *. Acta Neuropathol* 1982;56:167-78.
- [21] Hirschvogel K, Jurina K, Steinberg TA, et al. Clinical course of acute canine polyradiculoneuritis following treatment with human IV immunoglobulin. *J Am Anim Hosp Assoc* 2012;48:299-309.
- [22] Chetboul V. Cas clinique: polyradiculonévrite post-vaccinale. *Le Point vétérinaire* 1989;21:83-85.
- [23] Gutierrez-Quintana R, Cuesta-Garcia N, Wessmann A, Johnston P, Penderis J. Acute motor and sensory polyganglioradiculoneuritis in a cat: clinical and histopathological findings. *Journal of feline medicine and surgery* 2015;17:191-4.
- [24] Henke D, Vandeveld M, Oevermann A. Polyganglioradiculoneuritis in a young cat: clinical and histopathological findings. *J Small Anim Pract* 2009;50:246-50.
- [25] Granger N, Stalin CE, Brown TB, Jeffery ND. Idiopathic polyradiculoneuropathy in a Bengal cat: electrophysiological findings and 1 year follow-up. *Journal of feline medicine and surgery* 2008;10:603-7.
- [26] Bensfield AC, Evans J, Pesayco JP, Mizisin AP, Shelton GD. Recurrent demyelination and remyelination in 37 young Bengal cats with polyneuropathy. *J Vet Intern Med* 2011;25:882-9.
- [27] Jeandel A, Matiasek K, Blot S. Acute idiopathic polyneuritis with spontaneous remission in an Abyssinian cat. *Can Vet J* 2015;56:1279-82.
- [28] Malik R, France MP, Churcher R, Mc Donald B. Prednisolone responsive neuropathy in a cat. *Journal of Small Animal Practice* 1991;32:529-532.
- [29] Lane JR, de Lahunta A. Polyneuritis in a cat. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1984;20:1006-1008.
- [30] Wieczorek L, *Nervenzupfpräparation (Nerve Fiber Teasing) in der Diagnostik peripherer Neuropathien beim Tier - Methodik und*

*Interpretation-* in *Tierärztliche Fakultät* 2002, Ludwig-Maximilians-Universität.

- [31] Richardson KC, Jarett L, Finke EH. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol* 1960;35:313-23.
- [32] Weis J, Brandner S, Lammens M, Sommer C, Vallat J-M. Processing of nerve biopsies: A practical guide for neuropathologists. *Clinical Neuropathology* 2012;31:7-23.
- [33] Dyck PJ, Thomas PK, *Peripheral Neuropathy*. 2005, Philadelphia: Elsevier Saunders.
- [34] Sommer CL, Brandner S, Dyck PJ, et al. Peripheral Nerve Society Guideline on processing and evaluation of nerve biopsies. *J Peripher Nerv Syst* 2010;15:164-75.
- [35] Cuddon PA. Electrophysiology in neuromuscular disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2002;32:31-62.
- [36] FCI Agility commission. Agility Regulations of the Federation Cynologique International. 2013 [cited; Available from: <http://www.fci.be/de/Agility-45.html>].
- [37] Phillips DD, Hibbs RG, Ellison JP, Shapiro H. An electron microscopic study of central and peripheral nodes of Ranvier. *J Anat* 1972;111:229-38.
- [38] Volk HA, Shihab N, Matiassek K. Neuromuscular disorders in the cat: clinical approach to weakness. *Journal of feline medicine and surgery* 2011;13:837-49.
- [39] Gesellschaft für Neuropädiatrie, Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, Neurologie DGfr. S1-Leitlinie: Guillain-Barré Syndrom im Kindes- und Jugendalter. 2012 [cited].
- [40] Prineas JW. Pathology of the Guillain-Barre syndrome. *Annals of neurology* 1981;9 Suppl:6-19.
- [41] Kalichman MW, Chalk CH, Mizisin AP. Classification of teased nerve fibers for multicenter clinical trials. *J Peripher Nerv Syst* 1999;4:233-44.
- [42] Cummings JF, Haas DC. Coonhound paralysis. An acute idiopathic polyradiculoneuritis in dogs resembling the Landry-Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Sci* 1966;4:51-81.
- [43] Molin J, Marquez M, Raurell X, Matiassek K, Ferrer I, Pumarola M. Acute clinical onset chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in a dog. *Muscle & nerve* 2011;44:441-4.
- [44] Braund KG, Vallat JM, Steiss JE, Panangala VS, Zimmer PL. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in dogs and cats. *J Peripher Nerv Syst* 1996;1:149-55.
- [45] Uncini A, Kuwabara S. Electrodiagnostic criteria for Guillain-Barre syndrome: a critical revision and the need for an update. *Clinical*

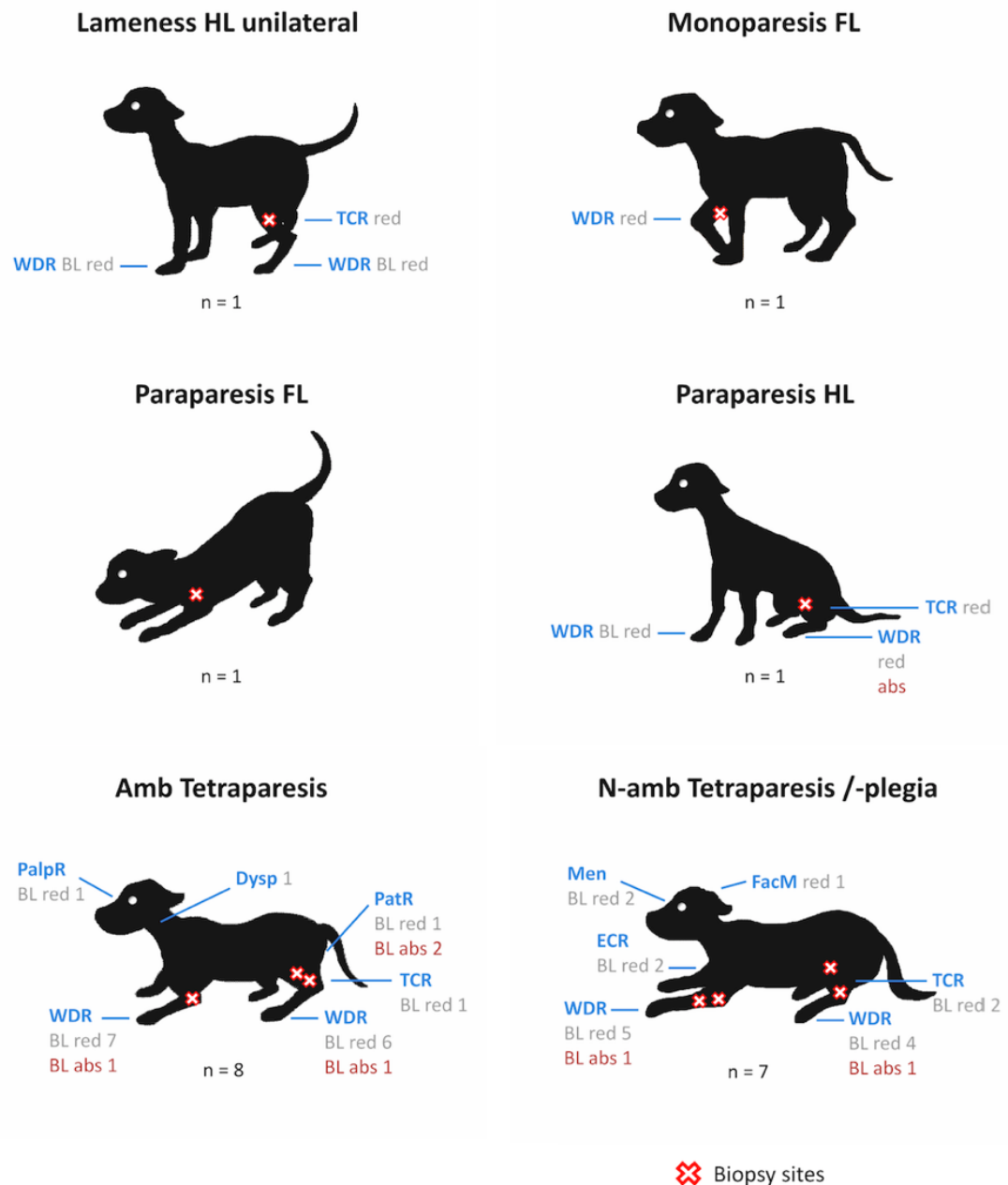
neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology 2012;123:1487-95.

- [46] Ho TW, Mishu B, Li CY, et al. Guillain-Barre syndrome in northern China. Relationship to *Campylobacter jejuni* infection and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 1995;118 ( Pt 3):597-605.
- [47] Kuwabara S, Yuki N, Koga M, et al. IgG anti-GM1 antibody is associated with reversible conduction failure and axonal degeneration in Guillain-Barré syndrome. *Annals of neurology* 1998;44:202-8.
- [48] Susuki K, Baba H, Tohyama K, et al. Gangliosides contribute to stability of paranodal junctions and ion channel clusters in myelinated nerve fibers. *Glia* 2007;55:746-57.
- [49] Griffin JW, Li CY, Macko C, et al. Early nodal changes in the acute motor axonal neuropathy pattern of the Guillain-Barre syndrome. *J Neurocytol* 1996;25:33-51.
- [50] Holt N, Murray M, Cuddon PA, Lappin MR. Seroprevalence of various infectious agents in dogs with suspected acute canine polyradiculoneuritis. *J Vet Intern Med* 2011;25:261-6.
- [51] Hadden RDM, Karch H, Hartung HP, et al. Preceding infections, immune factors, and outcome in Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 2001;56:758-765.
- [52] Arroyo EJ, Scherer SS. On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol* 2000;113:1-18.
- [53] Bader SR, Kothlow S, Trapp S, et al. Acute paretic syndrome in juvenile White Leghorn chickens resembles late stages of acute inflammatory demyelinating polyneuropathies in humans. *Journal of neuroinflammation* 2010;7:7.
- [54] McGuire TC, Fraser DG, Mealey RH. Cytotoxic T lymphocytes in protection against equine infectious anemia virus. *Anim Health Res Rev* 2004;5:271-6.
- [55] McGuire TC, Leib SR, Mealey RH, Fraser DG, Prieur DJ. Presentation and Binding Affinity of Equine Infectious Anemia Virus CTL Envelope and Matrix Protein Epitopes by an Expressed Equine Classical MHC Class I Molecule. *The Journal of Immunology* 2003;171:1984-1993.
- [56] Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *Journal of autoimmunity* 2015;64:13-25.



**Appendix. Supplementary material.**

Supplementary data to this article can be found online, at doi: 10.1016/j.nmd.2016.08.015).

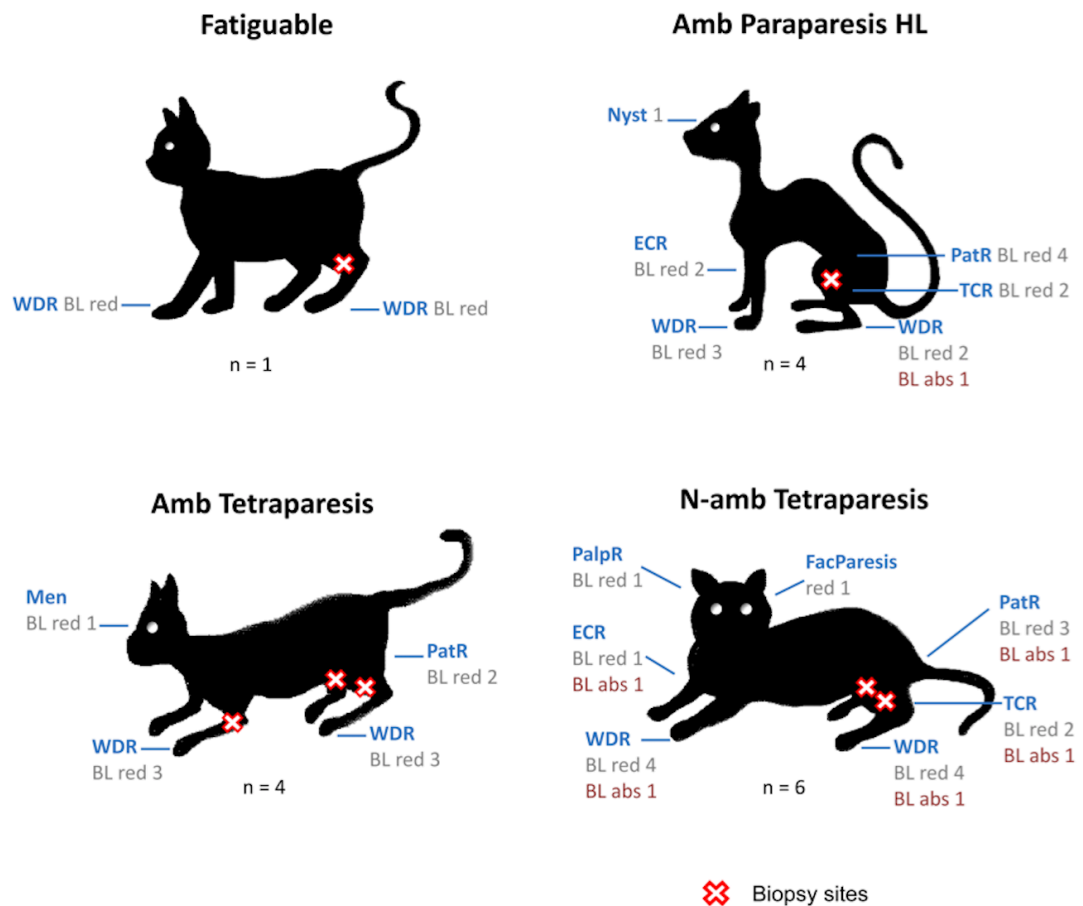


**Fig. S1.** Clinical presentation and biopsy sites in IMPN-affected dogs.

(A) Lameness hindlimbs unilateral (B) Monoparesis forelimbs (C) Paraparesis forelimbs (E) Ambulatory tetraparesis (F) Non-ambulatory tetraparesis/-plegia.

Withdrawal reflex (WDR), extensor carpi radialis reflex (ECR), patellar reflex (PatR), tibialis cranialis reflex (TCR), facial paresis (FacParesis), palpebral reflex (PalpR), menace response (Men), dysphonia (Dysp).

(BL bilateral; red reduced; abs absent).



**Fig. S2.** Clinical presentation and biopsy sites in IMPN-affected cats.

(A) Fatiguable (B) Ambulatory paraparesis (C) Ambulatory tetraparesis (E) Non-ambulatory tetraparesis.

Withdrawal reflex (WDR), extensor carpi radialis reflex (ECR), patellar reflex (PatR), tibialis cranialis reflex (TCR), facial paresis (FacParesis), palpebral reflex (PalpR) and menace response (Men).

(BL bilateral; red reduced; abs absent).

## **IV      TEILSTUDIE 2: ENTWICKLUNG EINES PROTOKOLLS FÜR DIE WHOLE-MOUNT-IMMUNHISTOCHEMIE VON NERVENFASERZUPFPRÄPARATIONEN**

**Fix the problem - a practical guide to whole-mount immunohistochemistry of teased nerve fibres\***

Simone Gross, Ninja Kolb, Marco Rosati, Kaspar Matiasek

Section of Clinical & Comparative Neuropathology, Institute of Veterinary Pathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany

\* Teilstudie 2 wurde mit redaktionellen Veränderungen publiziert (GROSS et al., 2017)

## **Abstract**

*Background:* Immunohistochemical staining of entire nerve fibres allows for studying the molecular composition of functional fibre subunits and may add to the diagnostic value of nerve fibre teasing.

*New method:* In this study we established a sealed-slide method for reproducible immunostaining of deep axoplasmic proteins in permanently straightened nerve fibres.

*Results:* Immunostaining of teased nerve fibres very much is facilitated by tip-fixation with biocompatible glass adhesives. Antibody penetration in fresh nerves can be achieved by thermic and chemical permeabilisation while enzymatic digestion still allows for sufficient permeability of many fibres after aldehyde fixation.

*Comparison with existing methods:* The methods recommended herein are easy to perform and represent a reliable and reproducible way to whole-mount immunostaining.

*Conclusions:* Sealed-slide immunostaining of tip-fixed and permeabilised nerve biopsies will help to validate neurophysiological abnormalities and to screen for target molecules and predictive markers of peripheral nerve disorders such as in inherited neuropathies and Guillain-Barré syndrome.

## 1. Introduction

Whole-mount immunohistochemistry (WMI) refers to labelling of tissue antigens in unsectioned samples by complete immersion in antibody solution. One of the greatest advantages of WMI is that it offers three-dimensional insights on stained structures within the context of naturally surrounding tissue (Luque et al., 1998).

Concerning the nervous system, WMI allows for tracking nerve fibres along their course to pursue their beginning and ending and to visualise their network including nerve fibre branching and interconnections (Hafer-Macko et al., 1996; Nemeth and Puri, 2000; Tam and Boyd, 1990). By using neuronal markers it is possible selectively to evaluate and quantify subgroups of nerve cells and to elucidate axonal details (Dun and Parkinson, 2015; Luque et al., 1998; Tam and Boyd, 1990). By no means, a similar resolution and three-dimensional impression can be gathered through histological sections as interslice distance makes it difficult to continuously follow axons and fibres that move in or out of the section plane (Dun and Parkinson, 2015). As much as histological sections are helpful to determine cellular and subcellular epitope distribution in the CNS (Kim et al., 2006) they fail to provide a truly three-dimensional view on epitope distribution throughout the tissue (Kim et al., 2006).

In lower vertebrates, WMI of the brain successfully has been performed in whole organisms as the medaka fry (*Oryzias latipes*) (Ishikawa and Hyodo-Taguchi, 1994). Larger species brains may require tissue permeabilisation and/or clearing to achieve sufficient penetration of the tissue and translucency for investigations in z-axis (Luque et al., 1998; Luque et al., 2001; Sillitoe and Hawkes, 2002). If stained properly, WMI proves superior to time-consuming three-dimensional reconstruction of stacked images from serial sections. Thereby it allows for contiguous determination of cellular distribution in the CNS, as nicely demonstrated for the cerebellum of mice (Sillitoe and Hawkes, 2002).

WMI also has been used for investigation of the peripheral nervous system (PNS). A particularly frequent PNS application is the WMI-based localisation of distal and intramural ganglia (Nemeth and Puri, 2000; Nemeth et al., 2001; Tam and Boyd, 1990; Teixeira et al., 1998). Moreover, WMI has been used to

evaluate nociceptive and autonomic (cholinergic, adrenergic and peptidergic) innervation of organs (Rysevaite et al., 2011). In all these studies WMI facilitated detection of specific fibre types and neurons, while the benefit to tackle subcellular epitopes in a tissue context has been insufficiently explored. WMI, however, can provide a detailed view on the molecular composition of individual peripheral nerve fibre subunits (Sherman et al., 2005) as juxtaparanodal-paranodal and nodal proteins that are essential for peripheral nerve conduction and lately turned-out to serve as targets of autoimmune disease such as Guillain Barré Syndrome (GBS) (Uncini and Kuwabara, 2015; Uncini et al., 2013). Likewise, WMI may be helpful to seek for tissue bound antibodies and thereby to narrow down their possible targets as an adjunct to serological studies in circulating anti-nerve antibodies (Hafer-Macko et al., 1996; Rupp et al., 2013; Willison, 2012).

So far, the paucity of contributions to WMI on peripheral nerve biopsies mirrors the difficulty of achieving reliable results in sparse tissues from clinical patients. In particular, it appears unlikely that the antibodies penetrate into the depth of the fascicle and pass the tightly insulating myelin sheath if axonal and adaxonal epitopes are to be addressed. Labelling of fibre components, therefore, requires separation of nerve fibres using teasing techniques on either fresh samples or those fixed with a WMI permissive fixative (formalin, paraformaldehyde) (Wieczorek, 2002).

As the yield of unsevered fibres in native material is very low and the diagnostician has to cope with extensive artefacts, aldehyde fixation usually is given preference. This, on the other hand, may renders antigen retrieval necessary, which by denaturation is likely to shrink and coil up nerve fibres and increases their rigidity making them prone to fragmentation upon stretching.

In larger tissues retraction can be countered by pinning the structures to silicon pads (Martin et al., 2015; Nemeth and Puri, 2000). Regarding isolated nerve fibres, with diameters of about 20 µm (Grant, 2006), this method does not work. Thus, we launched a trial to glue individual nerve fibres to glass slides to allow for a immunolabelling and longitudinal evaluation of all functional fibre subunits irrespective of possibly necessary antigen retrieval.

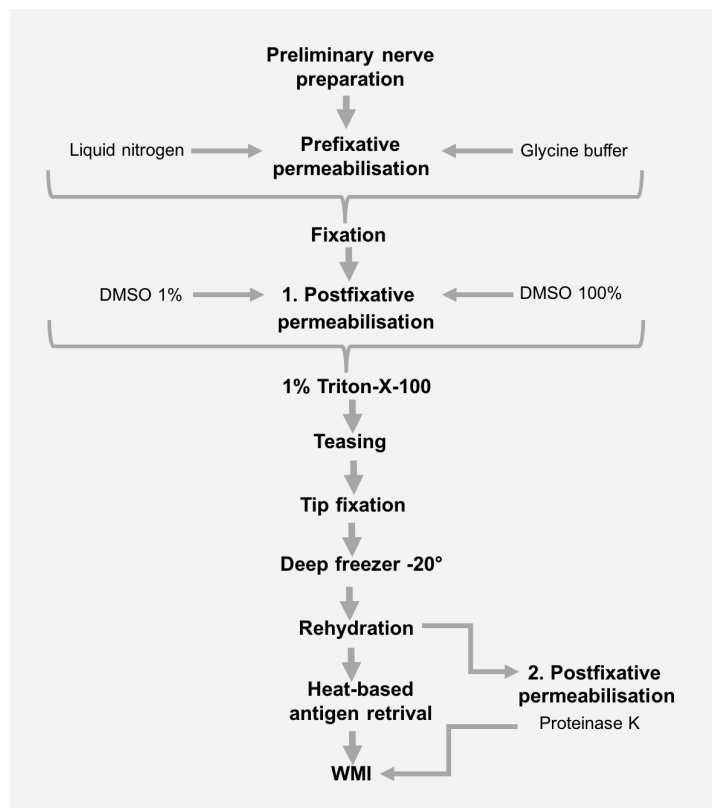
## 2. Materials and method

### 2.1 Sample collection

The study was conducted on biopsies and fresh postmortem samples of peroneal and ulnar nerves from various mammalian species that were taken for diagnostic reasons unrelated to the purpose of this study. The procedures carried out herein neither diminished the yield of diagnostic tissue nor interfered with the diagnostic workup.

### 2.2 Laboratory procedures

Overview of laboratory procedures is provided in Fig. 1.



**Fig. 1.** Overview of laboratory procedures.

#### 2.2.1 Immediate and preliminary nerve preparation and teasing

Harvested nerve samples were gently freed from epineurium and mesoneurial connective tissue using micro-scissors and tweezers. The perineurium was longitudinally incised and stripped from the endoneurium under a dissection

microscope (Olympus SZH, Zeiss Stemi DV4, Oberkochen, Germany). If exceeding 1 mm in diameter, fascicles were divided lengthwise into endoneurial bundles of no more than 1 mm diameter. With exception of samples dedicated to prefixative chemical or thermic treatment (see 2.2.3.1), nerve bundles underwent aldehyde fixation in either 4 % paraformaldehyde (PFA) or 10 % neutral buffered formalin for at least 1 hour at room temperature. Otherwise pretreated nerves were rinsed and then also immersed in these fixatives. Remnants of the aldehydes were removed by repeated rinses in 0.1 M Soerensen's phosphate buffer (pH 7.4). Nerve fibres scheduled for postfixative treatment with dimethyl sulfoxide (DMSO) were incubated overnight.

Thereafter, the nerves were directly transferred into 100 % glycerol for at least 1 hour before single nerve fibres and small fibre bundles were procured via nerve fibre teasing (NFT). As the nerves were unstained, an ultra-diffusive light-absorbing foil (Metal Velvet™, ACM Coatings, Sülzetal, Germany) was used to facilitate distinction of individual nerve fibres and interstitial tissue on epiluminescent microscopy. Per slide, a minimum of 10 untwisted fibre bundles was mounted on standard slides in parallel orientation and left for air drying at room temperature, tip-fixation and finally were transferred into the freezer (-20 °C) until further procession.

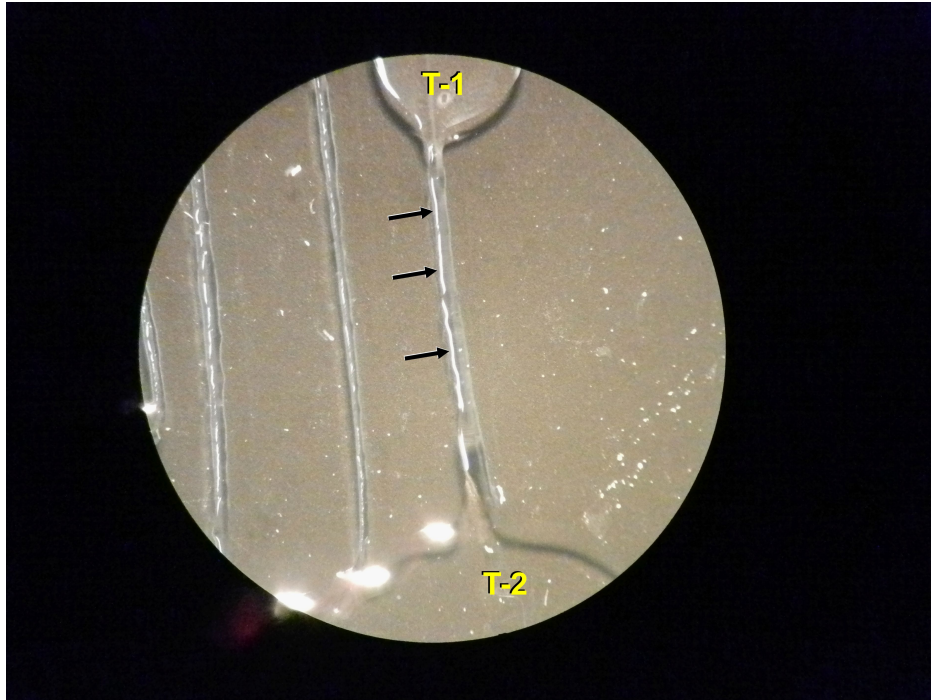
#### 2.2.2 Tip-fixation study

Prior to the immunohistochemical study, we tested different glues for their feasibility regarding nerve fibre tip-fixation onto glass slides.



### 2.2.2.1 Glue selection

#### 2.2.2.1.1 Required properties



**Fig.2.** Illustration of tip-fixation before curing. Both tips (T-1, T-2) of lubricated teased nerve bundles (arrows) are embedded in glue drops.

Appropriate tip-fixation requires the glue to firmly and persistently adhere to the histological slide and, thereby, to connect even lubricated nerve fibres to the glass surface without unwanted diffuence (see Fig. 2). For its use in WMI it has to withstand heat, humidity and buffer chemistry during microwave treatment and to cope with nerve shrinkage and constriction during heat denaturation. The glue must not encase the fibres to be stained, impact on tissue morphology and mask or mimic pathological nerve lesions. Furthermore, it should not influence epitope exposure, antibody affinity/avidity, and physicochemical composition of reagents used for WMI (Table 1). Lastly, the height of the convex meniscus of the glue drop should approximate that of thick myelinated fibres to allow for proper coverslipping, focussation and resolution on bright field microscopy.

**Table 1.** Parameters for glue selection.

Parameters	Required properties
<b>Adherence &amp; Stability</b>	Reluctance to dissolve
	Firmness of adhesion to biological tissue and glass
	Physicochemical resistance
<b>Nerve anchoring</b>	Fixation of wet nerve
	Fixation of denaturated nerve
	Lack of encasement
<b>WMI compatibility</b>	Insignificant antibody & chromagen adsorption
	Physicochemical inertia
<b>Microscopy compatibility</b>	Tightness of capillary fissure
	Glue dots of equal height enabling coverslipping parallel to slide surface
	Non-repellent to mounting/sealing agent
	No chemical interaction with mounting/sealing agent

Based on these criteria, a panel of glass adhering glues was selected (see Table 2).

**Table 2.** Selected glues.

Glue	Name	Company	Type	Chemistry	Curing time	Advertised advantages
1	AGT™ Flexibler Sekundenkleber	AGT company	Instant adhesive	Cyanacrylate	seconds	Super-fast curing, low viscosity (flat coating/tight sealing), flexible
2	UHU® Glas Spezialkleber	UHU	Special water-resistant adhesive for glass	Urethane acrylate ester	24 h	Specific glass adhesive, low viscosity (flat coating/tight sealing), dishwasher resistant
3	Coltogum® Montagekleber Super	Coltogum	Assembly adhesive	Polyurethane	24 h	Polymaterial adhesive, elastic
4	Araldite® 2020	Huntsman	Two-component adhesive	Epoxy resin	25 h	Specific glass adhesive, low-viscosity, heat- and water resistant

1: AGT™ Flexibler Sekundenkleber, Pearl GmbH, Buggingen, Germany, at the behest of the AGT company;

2: UHU® Glas Spezialkleber, UHU, Bühl, Germany;

3: Coltogum® Montagekleber Super, Coltogum, Rheineck, Swisse;

4: Araldite® 2020, Huntsman, Salt Lake City, USA

#### 2.2.2.1.2 Slide manipulation

Teased nerve fibres were mounted onto the glass slides as described before (see 2.2.1). Glycerol was dabbed off before the fibres were air-dried dehydrated and their tips were mounted with a tiny drop of glue on each side (Fig. 2). The slides afterwards were kept at room temperature until the adhesives were completely cured (Table 2). Then, the slides were deep frozen and stored at -20° for at least 18 hours until further processing. To test for resistance to heat during antigen retrieval the slides first underwent rehydration in phosphate buffered saline (PBS) for 1 hour, were then transferred into citrate buffer (10 mMol, pH 6.0) and underwent microwave treatment at 800W until boiling, followed by 20 min at 250W.

#### 2.2.2.1.3 Evaluation of the adhesives

Shape, height, binding properties, compaction, firmness and fragility of the adhesives were tested by visual examination with and without manipulation of the glue and nerve by micro-scissors and forceps. Levelling of the coverslip and diffuence of the glue were further evaluated at bright field microscopy using Axiophot® (Zeiss Instruments, Oberkochen, Germany) at magnifications ranging from x100 to x630. Only adhesives that successfully withheld microwave treatment were included in the immunohistochemical study (see 3.1).

#### 2.2.3 WMI Study

##### 2.2.3.1 Epitope selection, permeabilisation and antigen retrieval

As the aspired protocol was meant to guarantee for antigen labelling throughout even large myelinated Ia/b afferents and motor fibres, primary antibodies were directed at axoplasmic protein neurofilament-200 (NF200, mouse monoclonal, Clone NE14, Sigma-Aldrich, St. Louis, United States). Strategies for antibodies to penetrate into the axoplasm included chemical manoeuvres by (1) detergents, (2) a non-denaturing myelinolytic buffer, (3) enzymes and the use of (4) thermic forces as listed in the Table 3. As postfixative Proteinase K (Prot-K) treatment also proved to split aldehyde bridges, we evaluated its utility for antigen retrieval in comparison to the microwave treatment mentioned above

(2.2.2.1.2). All tests included incubation with Triton<sup>TM</sup>-X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) for one week at room temperature (RT).

**Table 3.** Applied chemical and physical permeabilisation techniques.

Reagent / method	Time	Type of exposure	Duration	Temperature
<b>Snap-F</b>	Prefixative	Shock-freezing	> 5 seconds	-196 °C
<b>Glyc-B</b>	Prefixative	Dipping	< 5 seconds	Room temperature
<b>DMSO 1 %</b>	Postfixative	Incubation	Overnight	Room temperature
<b>DMSO 100 %</b>	Postfixative	Incubation	Overnight	Room temperature
<b>Triton<sup>TM</sup>-X-100</b>	Postfixative	Incubation	7 days	Room temperature
<b>Prot-K</b>	Postfixative	Incubation	15 minutes	37 °C

### 2.2.3.2 WMI procedure

Tip-fixed fibres were framed by water repellent Dako Pen® (DAKO Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, United States) and rehydrated in PBS for 1 hour (Table 4). Afterwards nerve fibres were either subjected to postfixative chemical permeabilisation (see 2.2.3.1) or heat-based antigen retrieval (2.2.2.1.2).

Following several rinses in PBS, endogenous peroxidase was quenched by 30 min immersion in 0.3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS. After another rinses in PBS, the slides were coated with normal horse serum (ImmPRESS™, Vector, Burlingame, USA) for 30 minutes in a humid chamber, after which the supernatant was removed without additional washing.

As incubation with primary antibody was carried out for 4 days at RT, followed by 5 days at 37° C, we designed a sealed coverslip technique to avoid evaporation of fluids. Before mounting the slides with the secondary antibody polymers (ImmPRESS™, Vector, Burlingame, USA) for 30 min (RT), coverslips were removed with a razor blade and the slides were rinsed intensely with PBS. After the incubation, the specimens were rinsed again.

Visualisation of bound antibodies was achieved by diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB tablets 10 mg, Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Denmark) under visual control until discolouration became macroscopically evident. Chromagen reaction was stopped and precipitates were removed by rinses in Aqua bidest. and, subsequently, PBS.

In the end, the slides were mounted with 100 % water-free glycerol, coverslipped and lateral fissures were sealed with Histokitt® (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim/Röhn, Germany).

**Table 4.** Sequence of WMI steps.

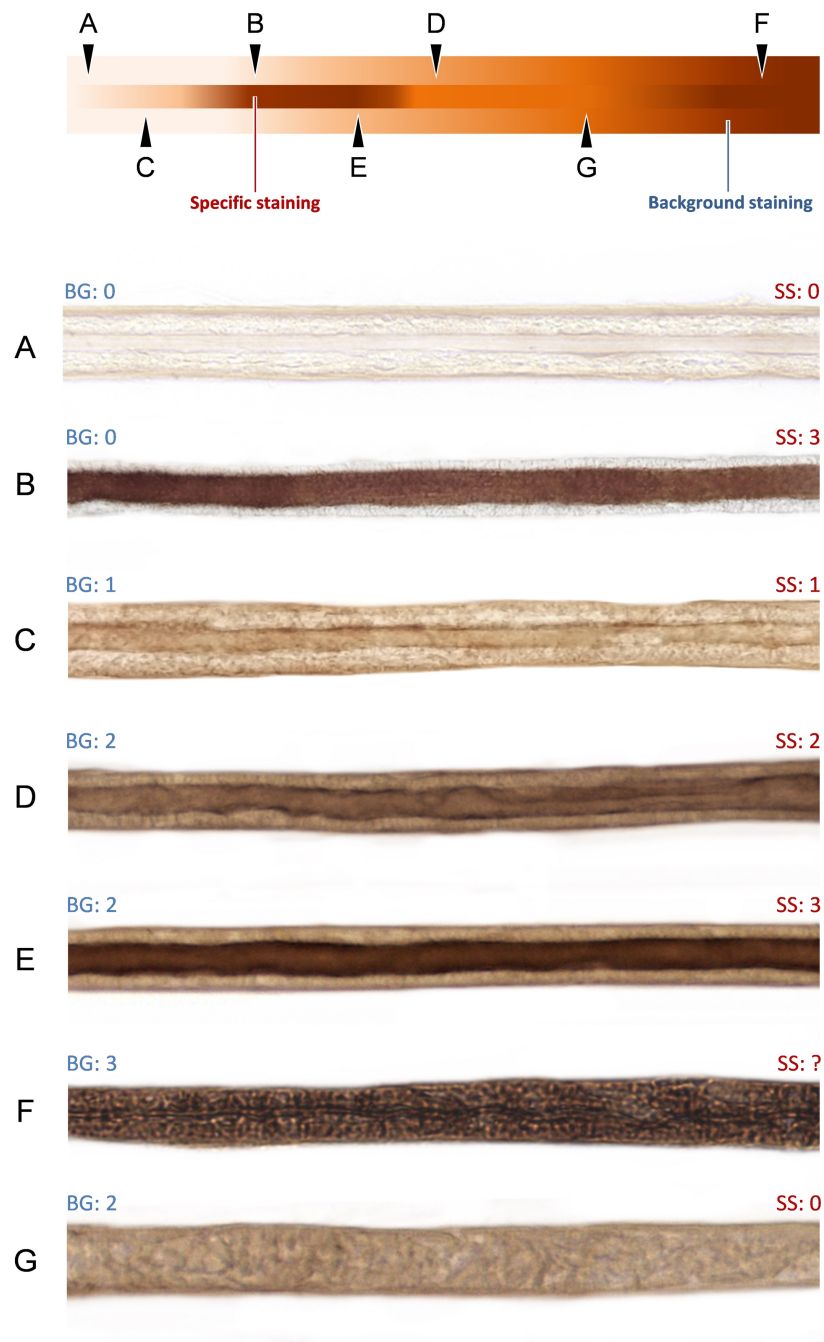
Step	Procedure	Time & repeats	Temperature/ condition	Reagents
1)	Rehydration	1 hour	Room temperature	0.01 M pH 7.0-7.6 PBS
2)	Washing	5 minutes each, 3 times	Room temperature	0.01 M pH 7.0-7.6 PBS
3)	Postfixative Treatment	15 minutes	37° C, humid chamber	Prot-K
	Or			
	Heat-based antigen retrieval	Until boiling	800 watt	Citrate buffer 10 mMol, pH 6.0
		20 minutes	250 watt	
		15 minutes	Room temperature	
4)	Washing	5 minutes each, 3 times	Room temperature	0.01 M pH 7.0-7.6 PBS
3)	Quenching of endogenous peroxidase	30 minutes	Room temperature	0.3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.01 M pH 7.0-7.6 PBS
4)	Washing	5 minutes each, 3 times	Room temperature	0.01 M pH 7.0-7.6 PBS
5)	Blocking of non-specific binding	30 minutes	Room temperature, humid chamber	2,5 % Normal horse serum, ImmPRESS™
6)	Incubation with primary antibody	4 days	Room temperature, humid chamber, 37° C,	1:1000, NF200 diluted in 1 % Triton™ X-0.01 M

		5 days	humid chamber	pH 7.3 PBS
7)	<b>Washing</b>	5 minutes each, 3 times	Room temperature	0.01 M pH 7.0- 7.6 PBS
8)	<b>Incubation with secondary antibody</b>	30 minutes	Room temperature, humid chamber	Polymer Anti- Mouse IgG Reagent, ImmPRESS™
9)	<b>Washing</b>	5 minutes each, 3 times	Room temperature	0.01 M pH 7.0- 7.6 PBS
10)	<b>Staining</b>	< 1min, until macroscopic discolouration	Room temperature	DAB
11)	<b>Blocking of staining and removal of precipitates</b>	5 minutes	Room temperature	Aqua bidest.
12)	<b>Washing</b>	5 minutes each, 3 times	Room temperature	0.01 M pH 7.0- 7.6 PBS
13)	<b>Mounting</b>	<10 seconds	Room temperature	100 % glycerine
14)	<b>Coverslipping and sealing</b>	<5 minutes	Room temperature	Histokitt®

### 2.2.3.3 Evaluation

Immunostained specimens were evaluated by two different raters with regards to topography and delineation of chromagen reaction. Assessment of WMI staining quality was sustained by the following parameters: intensity, consistence, continuity and background. Intensity scores ranged from (0) no specific staining, via (1) weak staining to (2) intense staining (Fig. 3).

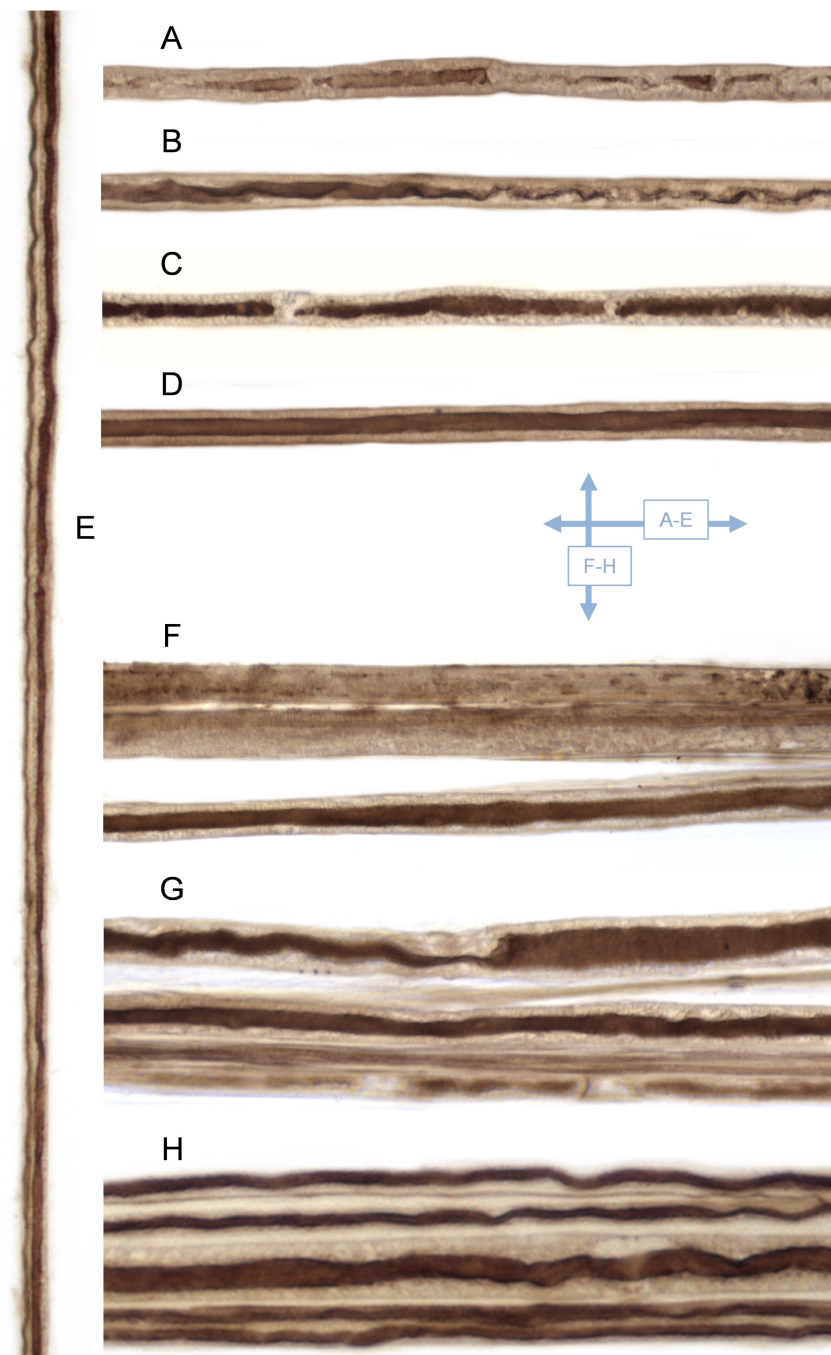




**Fig.3.** Intensity score for specific immunostaining (SS) of the axon and non-specific background staining (BG) of the nerve sheath. The cartoon illustrates the panel of combinations and refers to the examples provided below (A through G). A: negligible background staining and missing axonal staining in a negative control. B mirrors the optimal staining with no background and intense axonal immunopositivity as achieved in a fibre that underwent prefixative snap-freezing. BG score of 3 significantly masks axonal staining (F), while less BG still allows for detection (C,D,E) or exclusion (G) of NF200 staining.

Other parameters, as depicted in Fig. 4, embodied the distribution of specific staining across the bundle (consistence) and along the fibres (continuity). The staining was considered consistent (score 2) only if all axons across the bundle took up chromagen (Fig. 4). Incomplete staining of more than one axon across the bundle was regarded as inconsistent (score 1) (Fig. 4). Longitudinal continuity of axonal staining was graded 0 with unifocal staining, 1 with discontinuous immunopositivity, leaving the majority of the course unstained, 2 with minor interruptions of immunopositivity and 3 with continuous staining in between the edges (Fig. 4).

Apart from characteristics of specific staining, the evaluation enrolled assessment of non-specific background staining using the following stratification: (0) no background staining, (1) mild, (2) moderate (distinct but not interfering with clarity of specific staining) and (3) obliterative (strong and interfering with distinction of non-specific versus specific staining) (Fig. 3).



**Fig.4.** WMI assessment includes rating of longitudinal continuity (A-E) and involvement of axons per bundle (F-H). Axons may either be stained in a discontinuous fashion (A), partly continuous (B), predominantly continuous (C) or continuous throughout (D,E). Interrupted labelling was a constant feature upon Prot-K treatment (A). The screen, thereby, was conducted on at least three internodes. Concerning the penetration, bundles were either stained inconsistently, with single (F) or some (G) labelled axons, or all axons were involved (H).

#### 2.2.4 Data analysis

Outcome parameters of tip-fixation by different glues were compared using Chi-Square algorithms. The yield of immunopositive versus immunonegative fibres likewise was compared by Chi-Square test. Immunohistochemical scores were analysed via Kruskal-Wallis test. P values  $\leq 0.05$  were considered significant. Multiple comparisons employed Bonferroni correction.

### 3. Results

#### 3.1 Tip- fixation and physicochemical properties

A total of 614 glue dots were evaluated in accordance to the checklisted parameters (Table 5 and Fig. 5).

**Table 5.** Outcome of glue tip-fixation.

Parameters		Adhesive (total number of evaluated glue dots)			
		Glue n=168	Glue 2 n=138	Glue 3 n=140	Glue 4 n=166
Adhesion to glass slide	No	0/168	0/138	0/140	0/166
	Yes	168/168	138/138	140/140	166/166
		100 %	100 %	100 %	100 %
Dimensional stability	No	8/168	26/138	0/140	42/166
	Yes	160/168	114/138	140/140	124/166
		95.2 %	82.6 %	100 %	74.7 %
Flat curing	No	0/168	22/138	140/140	17/166
	Yes	168/168	118/138	0/140	149/166
		100 %	85.5 %	0 %	89.7 %
MWT resistence	No	29/168	33/138	0/140	0/166
	Yes	139/168	107/138	140/140	166/166
		82.7 %	77.5 %	100 %	100 %

Glue 1) AGT™ Flexibler Sekundenkleber, Pearl.GmbH, Buggingen, Germany at the behest of the AGT company; Glue 2) UHU® Glas Spezialkleber, UHU, Bühl, Germany; Glue 3)

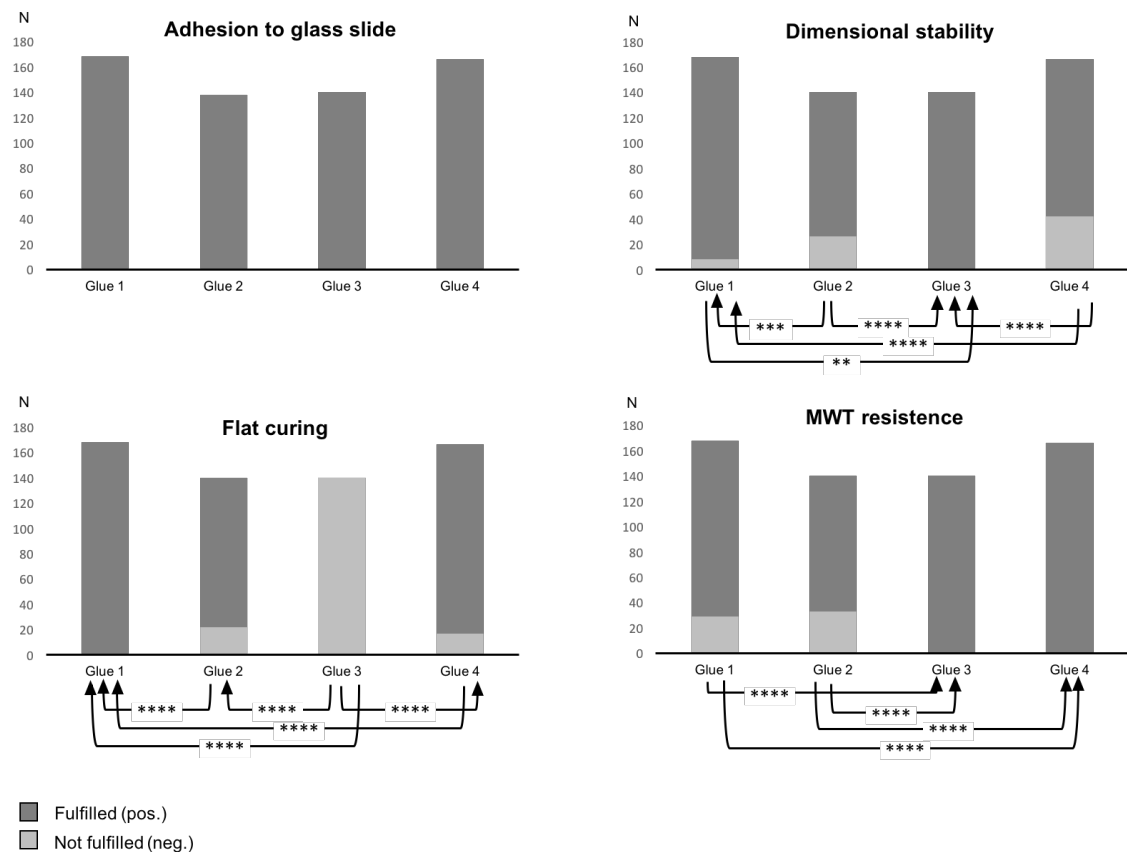
Coltugum® Montagekleber Super, Coltugum, Rheineck, Swisse; Glue 4) Araldite® 2020, Huntsman, Salt Lake City, USA

Firm adhesion to the glass surface was achieved with all glues used herein (100 % each;  $p > 0.99$ ). Even though being least viscous, extensive diffuence did not cause problem in Glue 1 due to fast curing time, lasting seconds only.

Low viscosity of Glue 1 allowed for small volumes and flattest curing amongst all adhesives tested (all  $p < 0.0001$ ) (Fig. 6). On the contrary, high viscoelasticity of Glue 3 prevented diffuence but rendered even coverslipping and microscopic focussation impossible due to the unpredictable but extensive height of glue drops (flat curing 0 %) (Fig. 6). The other two glues ranged in between these two extremes.

Compared to Glue 4, dimensional stability was better in Glue 2 (74.7 % vs. 82.6 %) while Glue 4 drops were slightly flatter (89.7 % vs. 85.5 %). The differences did not reach significance ( $p \geq 0.15$ ). Both glues allowed for appropriate coverslipping and slide reading in z-axis.

When it came to heat resistance and persistence of adhesion after microwave treatment, Glues 3 and 4 performed clearly best ( $p < 0.0001$  against the other glues;  $p > 0.99$  against each other), followed by Glue 1 that subsignificantly showed higher persistence than Glue 2 ( $p = 0.17$ ) (Fig. 5). All dots of Glue 3 and 4 persisted the procedure unaffected (100 %), while nearly 18 % of Glue 1 dots and about 25 % of Glue 2 dots came off the slide.



**Fig.5.** Outcome of material testing. Arrows indicate significant difference ( $p \leq 0.05$ ) with arrowheads pointing to the glue with better performance.

N: number of test samples

Glue 1: AGT<sup>TM</sup> Flexibler Sekundenkleber, Pearl.GmbH, Buggingen, Germany, at the behest of the AGT company;

Glue 2: UHU® Glas Spezialkleber, UHU, Bühl, Germany;

Glue 3: Coltogum® Montagekleber Super, Coltogum, Rheineck, Swisse;

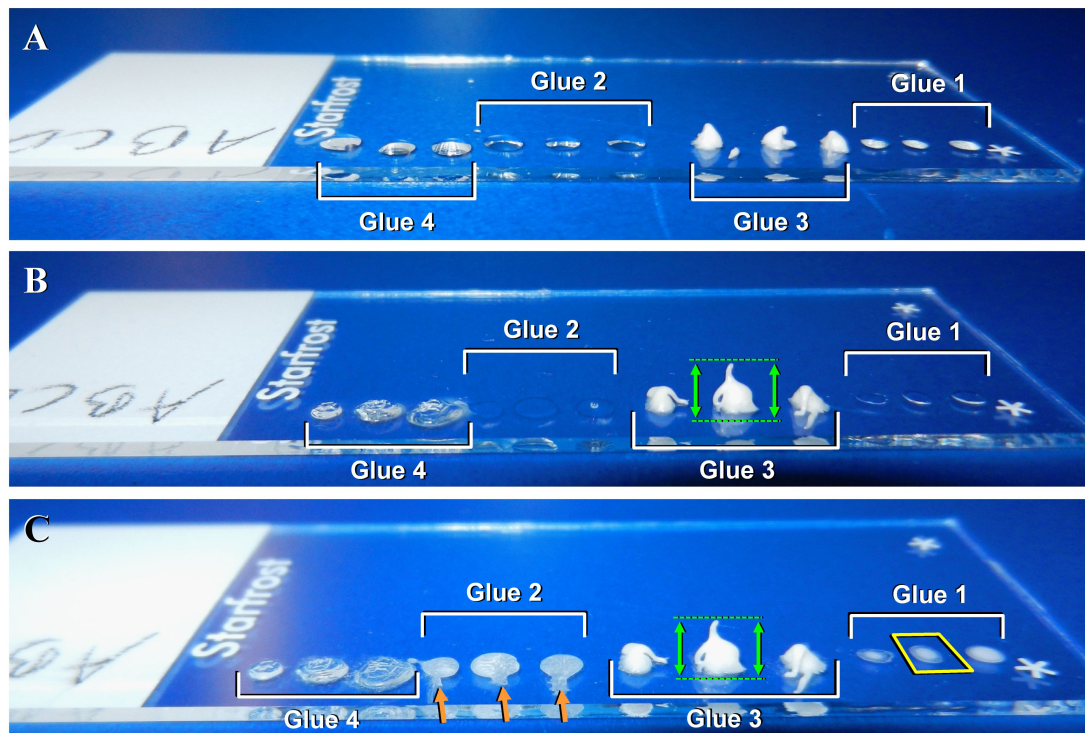
Glue 4: Araldite® 2020, Huntsman, Salt Lake City, USA

\*  $p \leq 0.05$

\*\*  $p \leq 0.01$

\*\*\*  $p \leq 0.001$

\*\*\*\*  $p \leq 0.0001$



**Fig.6.** Material properties before (A) and after (B) curing and microwave treatment (C). Note the differences in dimensional stability and meniscal height. Poor flattening of Glue 3 (green double pointed arrows) impedes coverslipping, while meniscal height of the other adhesives is compatible with coverslipping and microscopy. Glue 1 presents with optimal height but microwave treatment causes mild peripheral destabilisation as indicated by different colour and opacity of the core versus periphery (yellow frame). Glue 2 shows diffuence during heating (orange arrows). Glue 4 reveals best resistance amongst flat curing adhesives.

Glue 1: AGT<sup>TM</sup> Flexibler Sekundenkleber, Pearl GmbH, Buggingen, Germany, at the behest of the AGT company;

Glue 2: UHU® Glas Spezialkleber, UHU, Bühl, Germany;

Glue 3: Coltogum® Montagekleber Super, Coltogum, Rheineck, Swisse;

Glue 4: Araldite® 2020, Huntsman, Salt Lake City, USA



### **3.2. Outcome of WMI**

#### **a. Role of permeabilisation**

WMI trials for NF200 were performed in altogether 1053 tip-fixed fibre bundles. It proved not possible to elicit specific NF200 staining even after 9 days incubation time in myelinated fibres if permeabilisation had been omitted or was performed by prolonged incubation in Triton<sup>TM</sup>-X-100 or DMSO, only ( $p < 0.0001$ ). Effective permeabilisation techniques comprised prefixative snap-freezing with liquid nitrogen (Snap-F) or glycine buffer treatment (Glyc-B), and by postfixative Prot-K incubation (Fig. 7 and Table 6).

**Table 6.** Outcome of selected permeabilisation techniques.

N % of WMI positive bundles			Staining parameters													
			Intensity			Consistence			Continuity				Background			
			0	1	2	0	1	2	0	1	2	3	0	1	2	3
			Prot-K													
1a	11	36.4 %	7/11	4/11	0/11	4/11	0/11	0/11	4/11	0/11	0/11	0/11		x		
			63.6 %	36.4 %	0 %	36.4 %	0 %	0 %	36.4 %	0 %	0 %	0 %				
2a	23	21.7 %	18/23	5/23	0/23	5/23	0/23	0/23	5/23	0/23	0/23	0/23			x	
			78.3 %	21.7 %	0 %	21.7 %	0 %	0 %	21.7 %	0 %	0 %	0 %				
1c	16	62.5 %	6/16	10/16	0/16	10/16	0/16	0/16	10/16	0/16	0/16	0/16		x		
			37.5 %	62.5 %	0 %	62.5 %	0 %	0 %	62.5 %	0 %	0 %	0 %				
2c	12	16.7 %	10/12	2/12	0/12	2/12	0/12	0/12	2/12	0/12	0/12	0/12			x	
			83.3 %	16.7 %	0 %	16.7 %	0 %	0 %	16.7 %	0 %	0 %	0 %				
1b	12	83.3 %	2/12	0/12	10/12	0/12	10/12	0/12	0/12	0/12	10/12	0/12		x		
			16.7 %	0 %	83.3 %	0 %	83.3 %	0 %	0 %	0 %	83.3 %	0 %				
2b	14	35.7 %	9/14	5/14	0/14	5/14	0/14	0/14	5/14	0/14	0/14	0/14			x	
			64.3 %	35.7 %	0 %	35.7 %	0 %	0 %	35.7 %	0 %	0 %	0 %				
Glyc-B																
1b	36	91.7 %	3/36	0/36	33/36	0/36	0/36	33/36	0/36	0/36	21/36	12/36		x		
			8.3 %	0 %	91.7 %	0 %	0 %	91.7 %	0 %	0 %	58.3 %	33.3 %				
2b	38	50 %	19/38	19/38	0/38	19/38	0/38	0/38	19/38	0/38	0/38	0/38			x	
			50 %	50 %	0 %	50 %	0 %	0 %	50 %	0 %	0 %	0 %				

N % of WMI positive bundles			Staining parameters												
			Intensity			Consistence			Continuity			Background			
Snap-F															
1b	32	93.8 %	2/32	0/32	30/32	0/32	0/32	30/32	0/32	10/32	10/32	10/32		x	
			6.3 %	0 %	93.8 %	0 %	0 %	93.8 %	0 %	31.3 %	31.3 %	31.3 %			
2b	39	61.5 %	15/39	24/39	0/39	17/39	7/39	0/39	17/39	7/39	0/39	0/39			x
			38.5 %	61.5 %	0 %	43.6 %	17.9 %	0 %	43.6 %	17.9 %	0 %	0 %			
Glyc-B + Prot-K															
1b	27	74.1 %	7/27	0/27	20/27	0/27	20/27	0/27	11/27	0/27	9/27	0/27		x	
			25.9 %	0 %	74.1 %	0 %	74.1 %	0 %	40.7 %	0 %	33.3 %	0 %			
2b	24	75 %	6/24	0/24	18/24	0/24	18/24	0/24	10/24	8/24	0/24	0/24			x
			25 %	0 %	75 %	0 %	75 %	0 %	41.7 %	33.3 %	0 %	0 %			
Snap-F + Prot-K															
1b	28	82.1 %	5/28	0/28	23/28	0/28	23/28	0/28	8/28	0/28	15/28	0/28		x	
			17.9 %	0 %	82.1 %	0 %	82.1 %	0 %	28.6 %	0 %	53.6 %	0 %			
2b	21	81 %	4/21	17/21	0/21	0/21	17/21	0/21	9/21	8/21	0/21	0/21			x
			19 %	81 %	0 %	0 %	81 %	0 %	42.9 %	38.1 %	0 %	0 %			

Intensity: (0) no specific staining, (1) weak staining, (2) intense staining;

Consistence: (0) inconsistent, (1) partly consistent, (2) consistent;

Continuity: (0) discontinuity, (1) partly continuous, (2) predominantly continuous, (3) continuous;

Background: (0) no background staining, (1) mild, (2) moderate, (3) obliterative;

N: Number of examined nerve fibre bundles

1: Glue 1 (AGT™ Flexibler Sekundenkleber, Pearl GmbH, Buggingen, Germany, at the behest of the AGT company)

2: Glue 4 (Araldite® 2020, Huntsman, Salt Lake City, USA)

a: 9 days at RT

b: 4 days at RT + 5 days at 37°

c: 9 days at 37°

#### b. Yield of immunopositive bundles

In stark contrast to use of detergents only, all prefixative and postfixative permeabilisation techniques resulted in a significant improvement ( $p < 0.0001$ ) in that they allowed for specific axonal staining in as much as 35.7 % to 93.8 % of teased fibre bundles (see Table 6).

Being statistically significant or not, both permeabilisation method and type of glue impacted on the staining results obtained (Fig. 7).

Slides treated solely by Snap-F, Glyc-B or Prot-K, stained immunopositive in 91.7 %, 93.8 % and 83.3 % of bundles if tip-fixed with Glue 1 (Table 6). The intensity of immunostaining reached score 2 in all immunopositive fibres. Even though prefixative treatment resulted in a higher yield, this did not amount up to a significant difference if compared to postfixative enzymatic permeabilisation ( $p \geq 0.99$ ;  $\geq 0.30$  without Bonferroni correction).

The percentage of immunopositive bundles and their staining intensity decreased drastically if they were tip-fixed by Glue 4 ( $p \leq 3 \times 10^{-4}$ ). The yield went down to 50 % for Glyc-B, 61.5 % Snap-F and 35.7 % with Prot-K (Table 6). None of the positive axons here even reached intensity score 2.

Best staining rate for Glue 4 was achieved after dual permeabilisation by Snap-F (81 %) or Glyc-B (75 %) plus Prot-K, even though in both settings only a small subset of axons was stained per bundle and the immunopositivity did not extend over the entire length of the fibres.

#### c. Distribution and quality of immunostaining

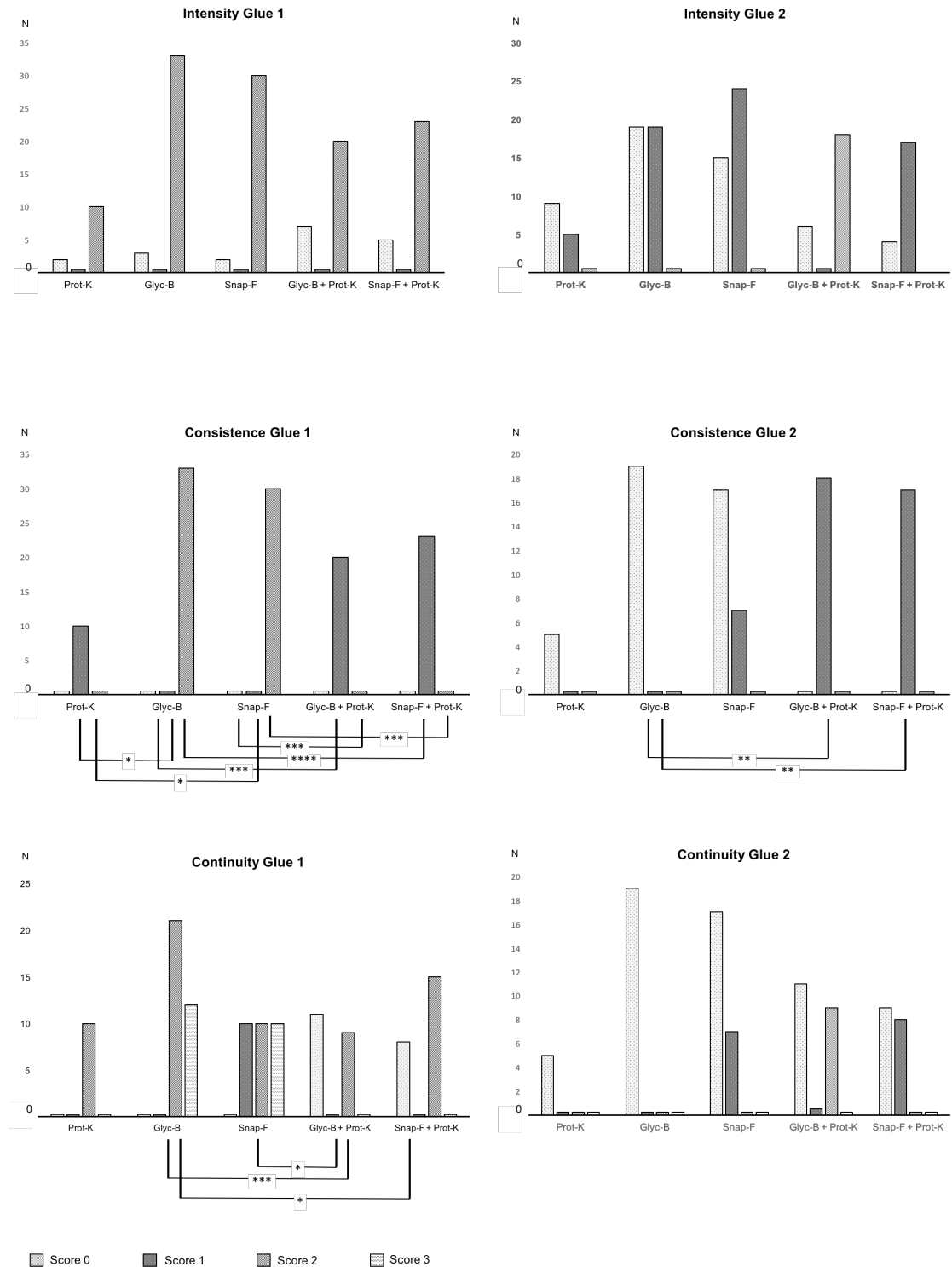
Thirty-six percent of Glue 1 fixed and immunopositive Glyc-B treated and 33 % of Snap-F immunopositive axons stained along their entire course (of at least 3 internodes). The remaining 63 % of immunopositive Glyc-B treated axons presented with sparse interruptions while another third of Snap-F snap-frozen fibres remained largely immunonegative. Upon Prot-K digestion immunopositivity for NF200 was largely uninterrupted (score 2). Taken together the differences between Glue 1 fixed fibres of these groups remained statistically insignificant ( $p \geq 0.99$ ) (Fig. 7).

Concerning the proportion of axons per bundle, Glyc-B and Snap-F treated

samples proved superior to Prot-K, as virtually all axons were successfully stained after prefixative permeabilisation ( $p > 0.99$ ; score 2 throughout) and proportion of stained fibres remained unpredictable upon enzymatic digestion ( $p \leq 0.03$ ; score 1 throughout) (Fig. 7).

Longitudinal and cross-sectional distribution of immunostaining was significantly limited if nerve fibres were tip-fixed with Glue 4 (Fig. 7). Hence, Glyc-B or Prot-K pretreatment lead to focal discontinuous staining of individual axons per segment, only. Even though freezing in Snap-F improved the yield of axons and extended their immunopositive course to a certain extent, the staining was patchy and involved less than 50 % of teased bundles (see Table 6).

Moreover, araldite compound always enhanced non-specific background staining ( $p < 0.0001$ ) independent of the permeabilisation technique applied ( $p > 0.99$ ). The intensity of the background staining, on the other hand, was not sufficient to interfere with microscopic detection of specific axonal staining (score less than 3 throughout).



**Fig.7.** Outcome of WMI after tip-fixation by glues 1 and 2

Brackets are indicating statistical significance.

N: number of test samples;

Glue 1: AGT<sup>TM</sup> Flexibler Sekundenkleber, Pearl.GmbH, Buggingen, Germany, at the behest of the AGT company;

Glue 2: Araldite® 2020, Huntsman, Salt Lake City, USA.

\*  $p \leq 0.05$

\*\*  $p \leq 0.01$

\*\*\*  $p \leq 0.001$

\*\*\*\*  $p \leq 0.0001$

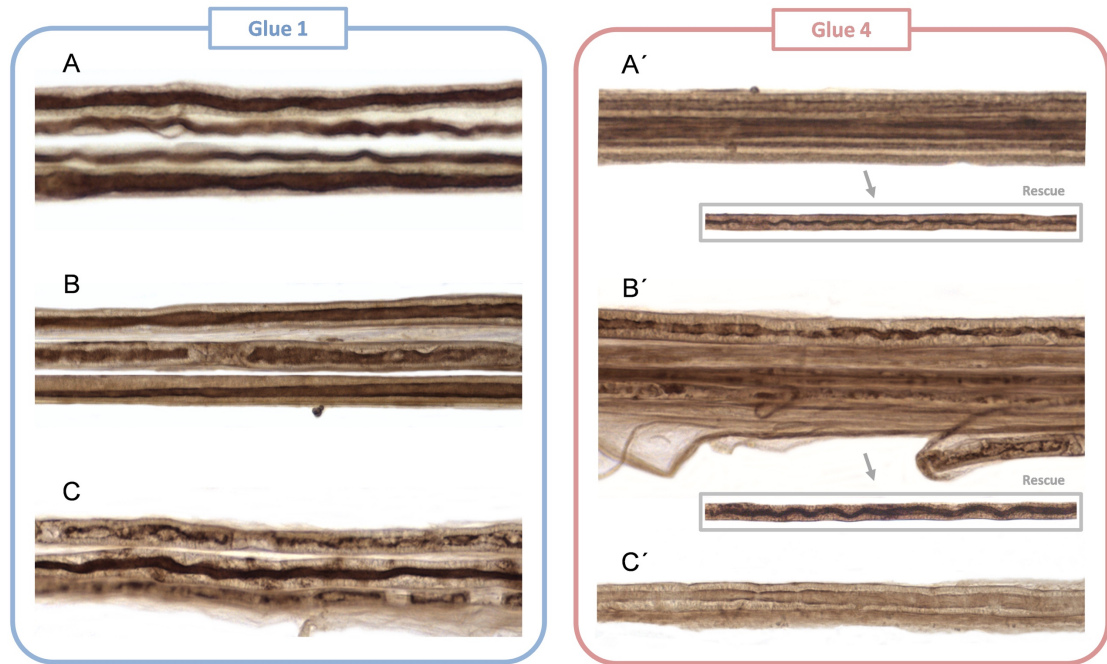
#### d. Efficacy of rescue maneuvers

Compromising effects of Glue 4 with regards to immunolabelling of prefixatively permeabilised fibres were reversed if the samples underwent additional Prot-K digestion before immunostaining (Fig. 8).

This was especially evident in samples treated with Glyc-B in which the number ( $p = 0.05$ ) and staining intensity ( $p = 1.2 \times 10^{-5}$ ) improved significantly and the difference to samples fixed with Glue 1 became insignificant ( $p = 0.08$ ). Prot-K co-treatment also improved the distribution of immunostaining ( $p \leq 0.006$ ) but did not reach the same levels as in fibres tip-fixed by Glue 1 ( $p \geq 0.0001$ ).

Based on the results established herein, immunostaining after Prot-K could not be improved by performing the entire incubation with primary antibody at 37° for nine days.

In case of absent, discontinuous and incomplete immunostaining upon permeabilisation, microwave-treatment did not improve the staining. In Prot-K treated nerves, microwave heating abolished immunodetection completely.

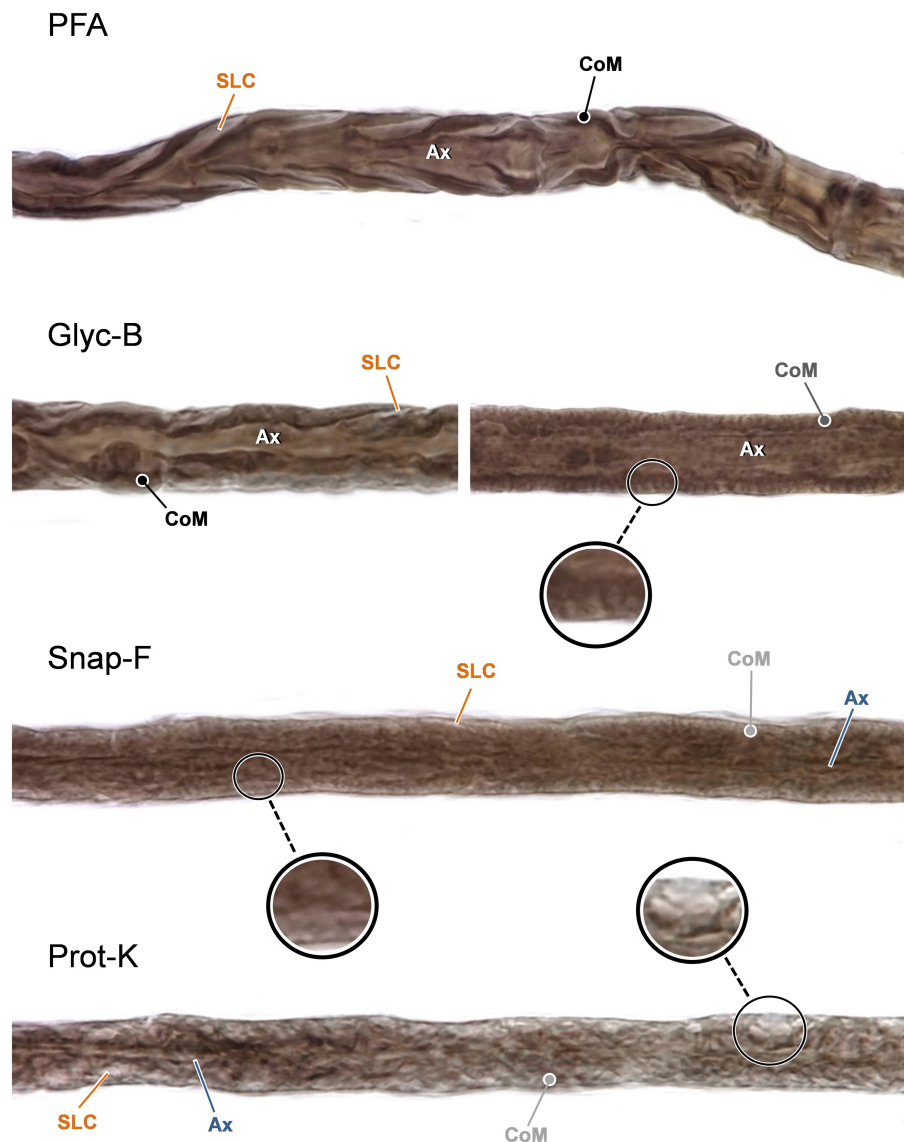


**Fig.8.** Photomicrographs of immunostained nerves summarising the results. Staining results were better in Glue 1 for all procedures. Reliable immunolabelling was achieved after Snap-F (A,A') and Glyc-B treatment (B,B') before fixation. Digestion of prefixed fibres by Prot-K always lead to discontinuous and incomplete staining (C,C'). Less favourable results upon tip-fixation by Glue 4 (A',B',C') indicates interference with antibody penetration or epitope exposure. Notably, the staining could be substantially improved (inlets) if the fibres underwent double treatment by Snap-F or Glyc-B and Prot-K.

#### e. Pathomorphological consequences after fibre permeabilisation

Regardless of the positive staining fraction, Prot-K digestion lead to most severe structural changes of both, myelin sheath and axon (Fig. 9). Treatment of unfixed fibres by Snap-F and Glyc-B also induced disruptive myelin changes (Fig. 9). Thereby the micromorphology of fibres, dipped in Glyc-B, was better preserved than that of snap-frozen fibres and allowed for proper assessment of myelin thickness and compaction, as well as of Schmidt-Lanterman clefts (SLC) in a majority of fibres. Upon freezing, myelin substance appeared more vacuolated, while losing contrast to non-compacted myelin and the axon. Evaluation of relative myelin thickness was only discontinuously possible. SLC were poorly delineated. Compared to Glyc-B, the morphological presentation was quite similar amongst all fibres. Glyc-B treated fibres, on the contrary, showed mild variations as depicted in Fig.9.





**Fig.9.** Impact of thermal, chemical and enzymatic permeabilisation on nerve fibre morphology compared to PFA fixation, only. Despite its myelinolytic properties, Glyc-B resulted in zero (left) to subtle (right) changes of fibre appearance in terms of attenuation of SLC, loss of staining contrast and vacuolation of compacted myelin (CoM). The axon (Ax) remained visible in most fibres. Myelin sheath disintegration was more severe after Snap-F. Distinction of myelin sheath and axon or adaxonal space often was impossible (inlet). Fibre damage was worst upon Prot-K digestion resulting in fragmentation and dissolution of myelin substance that gave way for patchy non-specific immunostaining (as seen in Fig.7).

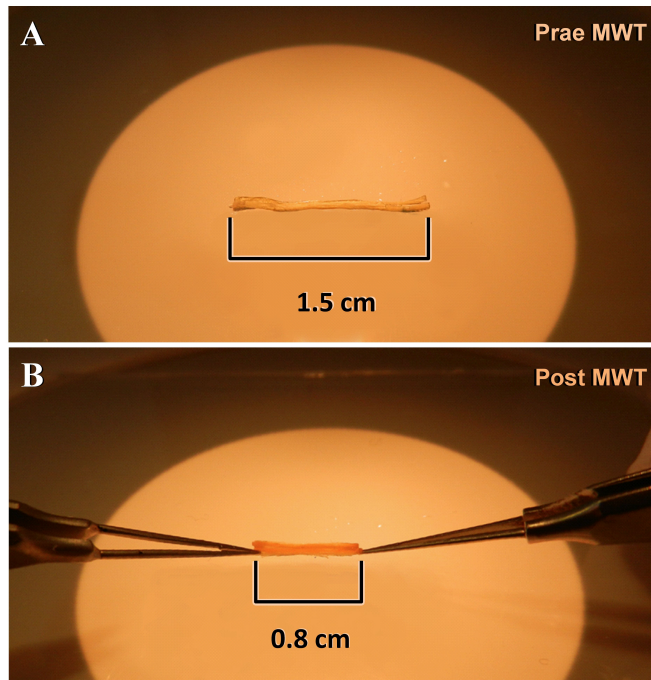
#### **4. Discussion**

This study was launched to establish guidelines for reproducible WMI of teased myelinated nerve fibres as an adjunct to conventional teasing studies, in which staining is restricted mainly to myelin substance and cell nuclei (Gross et al., 2016).

WMI enables to screen for specific pathogens, organella and target molecules along the course of a nerve fibre, including its subsegmental compartments nodes, paranodes, juxtaparanodes, stereotypic internodal segments, SLC, inner and outer cytoplasmic pouches and perinuclear Schwann cell cytoplasm. Even longitudinal sections hardly allow for evaluation of more than two internodes in a row. Hence, NFT helps to identify details likely to be overseen in sections due to their distribution pattern (Dun and Parkinson, 2015; Dyck and Thomas, 2005; Sommer et al., 2010; Weis et al., 2012). Ideally, these teased fibres allow for co-registration of specific morphostructural features and marker expression. Bimodal approaches, that way, could help to overcome limitations posed by paucity of nerve fibres and lesion sites in clinical biopsy material.

Still, reports that successfully used WMI in teased fibres are exceedingly rare (Arnaud et al., 2009; Hafer-Macko et al., 1996; Rupp et al., 2013; Stathopoulos et al., 2015). This might be because teased fibre studies have been perceived cost extensive and of limited diagnostic utility (Sommer et al., 2008), an argument we surely do not agree with, as some disorders require an insight into sequential functional subunits for thorough classification (Gross et al., 2016; Uncini et al., 2013). Other obstacles result from technical problems. Most often WMI is performed on floating tissues surrounded by reagents and buffers in tubes or wells (Rosa-Molinar et al., 1999; Sawada et al., 2008). This method requires large volumes of working solutions. Tissues, expected to coil up, better may be pinned onto a pad as reported for staining of intramuscular phrenic nerve branches within diaphragm and for intramural ganglia in Hirschsprung's disease (Martin et al., 2015; Nemeth and Puri, 2000). Elastic tissue components also cause recoil in peripheral nerve fibres, which may be negligible if there is no need for systematic and reproducible evaluation of longitudinal fibre courses and if heat-based antigen-retrieval is unnecessary. Upon aldehyde fixation, however, the access to certain epitopes may be obliterated. In contrast to

histological slides, microwave treatment of individual nerve fibres results in extensive coil up due to protein denaturation, which precludes proper assessment if not straightened out permanently on slides, feasible for microscopy, before application of heat (Fig. 10).



**Fig. 10.** Tissue retraction due to heat-based denaturation. Upon microwave treatment, nerve fascicles shrink to about half of the original length. Tip-fixation effectively prevented the retraction on the slide.

As teased fibres from clinical biopsies just may have a length of 8 mm and measure less than 20  $\mu\text{m}$  in diameter (Grant, 2006), individual fibre fixation appears delicate and sophisticated. It came to our mind that anchoring nerve stumps by embedding in microwave compatible glass adhesives may allow for reading of immunolabelled nerve fibres even after antigen demasking if they are heat resistant, chemically inert and compatible with coverslipping.

Testing a couple of industrial adhesives, indeed, we identified two commercial glues embalming and curing properties of which guaranteed for excellent tip-fixation of lubricated nerve tissue with however some differences in (1) microwave resistance, (2) interference with immunostaining and (3) impact on coverslipping. Material properties were most favourable in instant adhesive, Glue 1, and araldite compound, Glue 4. The other adhesives were excluded from immunohistochemical trial as Glue 2 clearly had detrimental dimensional

stability (compared to Glue 1) and microwave resistance (compared to Glue 4). Also Glue 3 was expelled as the advantage of dimensional stability, permanent fixation and microwave resistance was counteracted by extensive and inconsistent height of glue drops that precluded neat and even coverslipping and thereby high power field microscopy.

With a minor drawback of about 17 % of nerve tips coming off during microwave treatment, the exceedingly fast and flat curing and chemical inertia rendered Glue 1 most handy to be used as adhesive in daily laboratory practice. In contrast to Glue 4, which was more heat resistant, it did not negatively impact on immunolabelling but allowed for excellent staining in as much as 93.8 % of tip-fixed bundles upon appropriate permeabilisation. The glue also withstood capillary forces and shearing stress applied during repeated coverslipping-decoverslipping in the “sealed chamber” approach used herein. The latter turned out to be an effective and antibody sparing incubation method by avoiding antiserum diffuence and evaporation during the 9 days of immersion with primary antibody serum at 37 °C.

For evaluation of penetration and staining efficacy we chose axonal marker NF200 and studied most thickly myelinated A(alpha) fibres, including alpha-motor neurons and Ia/b afferents (Lawson and Waddell, 1991; Pierce et al., 2006).

Even in single teased fibres, the inner endoneurial collagen sheath and unsevered myelin tube represent significant barriers for antibodies, driven by Brown molecular movement only, to reach epitopes hidden deeply in myelin sheath, adaxonal compartment of Klebs, axolemma and axoplasm. Hence, without fibre permeabilisation, NF200 staining was negative throughout. Far best immunostaining was achieved by prefixative manipulation via either Snap-F or collagenolytic Glyc-B.

Even if applied on vulnerable unfixed nerve fibres, dipping in Glyc-B insignificantly compromised histological evaluation of nodal-paranodal integrity, SLC, degree of myelination, fibre diameter and continuity, as well as of nuclear and cytoplasmic Schwann cell features. As fascicles of 1 mm diameter were dipped in Glyc-B without preceding fibre separation, it can be speculated that

minor exposure to the agent in the fascicle core resulted in milder changes even though it did not impair NF200 staining of the axon. Morphological preservation was more uniform but slightly less favourable after Snap-F, as the myelin substance was more vigorously vacuolated. Previous studies indeed have shown that snap freezing causes microfissures of myelin sheath, splitting of myelin spiral plus acquisition of aqueous channels (Meller, 1998). Respective myelin changes, however, did not interfere with assessment of fibre continuity, demyelination, nodo-paranodopathies and infiltrative changes. As immunostaining was sometimes even better upon Snap-F than after myelinolytic and collagenolytic Glyc-B, it seems that the myelin sheath is the main barrier for antibody penetration, while the oblitative effects of basement membranes and endoneurial collagen may be overestimated.

Which of the procedures is to be recommended, very much depends on the individual setting and in particular the availability of liquid nitrogen and sample size. In our lab, Snap-F has become the method of choice for WMI on nerve biopsies accompanied by muscle tissue that requires Snap-F for cryohistology anyway. If only nerve tissue has been submitted or separation and splitting of nerve fascicles is complicated by fibrotic changes, we tend to use Glyc-B for permeabilisation and for facilitation of gentle fibre separation. Prefixative permeabilisation may not be possible if a sample has been shipped from distant places or if immunostaining has to be performed on archived material. Glutaraldehyde fixation, as used for microscopic and ultrastructural studies (2.5 %), abolishes epitope detection after 1-3 hours of immersion only (Mirzaie et al., 2000; Stradleigh and Ishida, 2015). For immunolabelling, fixation in 10 % neutral buffered formalin or, even better, 4 % PFA is favourable. Concerning marker NF200, both aldehydes performed likewise. Aldehydes however cause aminogroup cross-linking by methylene bridges (Fraenkel-Conrat and Olcott, 1948; Stradleigh and Ishida, 2015). Side effects of fixation are (1) coiling-up of fibres and increased tissue rigidity, (2) decreased tissue permeability and (3) epitope masking. While the first factors efficiently can be counteracted by tip-fixation, vigorous chemical treatment is needed post hoc to allow for antibody penetration. It proved impossible to achieve appropriate permeabilisation by detergents only. Therefore we used Prot-K to degrade denaturated tissue proteins and to retrieve possibly demasked epitopes. Positive staining indeed

could be elicited in some nerve fibres of as much as 83 % of tested fibre bundles with acceptable longitudinal tracing of the axons across multiple internodes. Compared to prefixative permeabilisation, however, only a subset of myelinated fibres per bundle was stained and preservation of myelin sheath was less upon enzymatic digestion. Prot-K therefore should be considered primarily for retrospective analyses, studies that do not rely on structural integrity of myelin sheath and those that only accomplish morphological assessment of teased nerve fibres. For small biopsies to be stained with markers that require heat-based antigen retrieval, Prot-K may be used in addition to prefixative permeabilisation as it has shown to reverse negative effects on immunostaining by araldite adhesives (Fig. 9).

In summary, the protocols introduced herein represent easy to perform and robust techniques to immunostain and evaluate teased nerve fibres of fresh and archived nerve samples, likewise. Their potential to promote successful, reliable and reproducible multicentric marker studies in peripheral nerve research and diagnostics remains to be further explored. By tracing autoantibodies and target antigens, WMI in particular will help us to understand the immunobiology of GBS-like polyradiculoneuropathies and to establish biomarkers for subtype specific therapies.

## Abbreviations

DAB	diaminobenzidine tetrahydrochloride
DMSO	dimethyl sulphoxide
Glyc-B	glycine buffer
GBS	Guillain-Barré Syndrome
NF200	neurofilament-200
NFT	nerve fibre teasing
PBS	phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehyde
PNS	peripheral nervous system
Prot-K	Proteinase K
RT	room temperature
SLC	Schmidt-Lanterman clefts
Snap-F	snap-freezing with liquid nitrogen
WMI	Whole-mount immunohistochemistry

## References

- Arnaud E, Zenker J, de Preux Charles AS, Stendel C, Roos A, Medard JJ, Tricaud N, Kleine H, Luscher B, Weis J, Suter U, Senderek J, Chrast R. SH3TC2/KIAA1985 protein is required for proper myelination and the integrity of the node of Ranvier in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009; 106: 17528-33.
- Dun XP, Parkinson DB. Visualizing peripheral nerve regeneration by whole mount staining. *PloS one*, 2015; 10: e0119168.
- Dyck PJ, Thomas PK. *Peripheral Neuropathy*. Elsevier Saunders: Philadelphia, 2005.
- Fraenkel-Conrat H, Olcott HS. The reaction of formaldehyde with proteins; cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups. *J Am Chem Soc*, 1948; 70: 2673-84.
- Grant G. The 1932 and 1944 Nobel Prizes in physiology or medicine: rewards for ground-breaking studies in neurophysiology. *J Hist Neurosci*, 2006; 15: 341-57.
- Gross S, Fischer A, Rosati M, Matiassek L, Corlazzoli D, Cappello R, Porcarelli L, Harcourt-Brown T, Jurina K, Garosi L, Flegel T, Quitt P, Molin J, Huelsmeyer VI, Schenk H, Gandini G, Gnirs K, Blot S, Jeandel A, Baroni M, Loderstedt S, Abbiati G, Leithaeuser C, Schulze S, Kornberg M, Lowrie M, Matiassek K. Nodoparanodopathy, internodopathy and cleftopathy: Target-based reclassification of Guillain-Barre-like immune-mediated polyradiculoneuropathies in dogs and cats. *Neuromuscul Disord*, 2016; 26: 825-36.
- Hafer-Macko C, Hsieh ST, Li CY, Ho TW, Sheikh K, Cornblath DR, McKhann GM, Asbury AK, Griffin JW. Acute motor axonal neuropathy: an antibody-mediated attack on axolemma. *Annals of neurology*, 1996; 40: 635-44.
- Ishikawa Y, Hyodo-Taguchi Y. Cranial nerves and brain fiber systems of the medaka fry as observed by a whole-mount staining method. *Neurosci Res*, 1994; 19: 379-86.
- Kim SH, Che P, Chung SH, Doorn D, Hoy M, Larouche M, Marzban H, Sarna J, Zahedi S, Hawkes R. Whole-mount immunohistochemistry of the brain. *Curr Protoc Neurosci*, 2006; Chapter 2: Unit 2 10.
- Lawson SN, Waddell PJ. Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *J Physiol*, 1991; 435: 41-63.
- Luque JM, Adams WB, Nicholls JG. Procedures for whole-mount immunohistochemistry and in situ hybridization of immature mammalian CNS. *Brain Res Brain Res Protoc*, 1998; 2: 165-73.
- Luque JM, Morante-Oria J, Riederer BM, Fairen A. Whole-mount confocal immunofluorescence of mammalian CNS. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2001; 6: 129-33.
- Martin M, Li K, Wright MC, Lepore AC. Functional and morphological assessment of diaphragm innervation by phrenic motor neurons. *J Vis Exp*,



2015: e52605.

Meller K. Morphology of cryofixed myelin sheath. *Int Rev Cytol*, 1998; 184: 81-108.

Mirzaie M, Meyer T, Saalmuller A, Dalichau H. Influence of glutaraldehyde fixation on the detection of SLA-I and II antigens and calcification tendency in porcine cardiac tissue. *Scand Cardiovasc J*, 2000; 34: 589-92.

Nemeth L, Puri P. The innervation of human bowel mucosa and its alterations in Hirschsprung's disease using a whole-mount preparation technique. *Pediatr Surg Int*, 2000; 16: 277-81.

Nemeth L, Yoneda A, Kader M, Devaney D, Puri P. Three-dimensional morphology of gut innervation in total intestinal aganglionosis using whole-mount preparation. *J Pediatr Surg*, 2001; 36: 291-5.

Pierce LM, Rankin MR, Foster RT, Dolber PC, Coates KW, Kuehl TJ, Thor KB. Distribution and immunohistochemical characterization of primary afferent neurons innervating the levator ani muscle of the female squirrel monkey. *Am J Obstet Gynecol*, 2006; 195: 987-96.

Rosa-Molinar E, Proskocil BJ, Ettel M, Fritzsche B. Whole-mount procedures for simultaneous visualization of nerves, neurons, cartilage and bone. *Brain Res Brain Res Protoc*, 1999; 4: 115-23.

Rupp A, Galban-Horcajo F, Bianchi E, Dondi M, Penderis J, Cappell J, Burgess K, Matiassek K, McGonigal R, Willison HJ. Anti-GM2 ganglioside antibodies are a biomarker for acute canine polyradiculoneuritis. *J Peripher Nerv Syst*, 2013; 18: 75-88.

Rysevaite K, Saburkina I, Pauziene N, Vaitkevicius R, Noujaim SF, Jalife J, Pauza DH. Immunohistochemical characterization of the intrinsic cardiac neural plexus in whole-mount mouse heart preparations. *Heart Rhythm*, 2011; 8: 731-8.

Sawada K, Fukui Y, Hawkes R. Spatial distribution of corticotropin-releasing factor immunopositive climbing fibers in the mouse cerebellum: analysis by whole mount immunohistochemistry. *Brain Res*, 2008; 1222: 106-17.

Sherman DL, Tait S, Melrose S, Johnson R, Zonta B, Court FA, Macklin WB, Meek S, Smith AJ, Cottrell DF, Brophy PJ. Neurofascins are required to establish axonal domains for saltatory conduction. *Neuron*, 2005; 48: 737-42.

Sillitoe RV, Hawkes R. Whole-mount immunohistochemistry: a high-throughput screen for patterning defects in the mouse cerebellum. *J Histochem Cytochem*, 2002; 50: 235-44.

Sommer C, Brandner S, Dyck PJ, Magy L, Mellgren SI, Morbin M, Schenone A, Tan E, Weis J, Enmc. 147th ENMC international workshop: guideline on processing and evaluation of sural nerve biopsies, 15-17 December 2006, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*, 2008; 18: 90-6.

Sommer CL, Brandner S, Dyck PJ, Harati Y, LaCroix C, Lammens M, Magy L, Mellgren SI, Morbin M, Navarro C, Powell HC, Schenone AE, Tan E, Urtizberea A, Weis J, Society PN. Peripheral Nerve Society Guideline on processing and

evaluation of nerve biopsies. *J Peripher Nerv Syst*, 2010; 15: 164-75.

Stathopoulos P, Alexopoulos H, Dalakas MC. Autoimmune antigenic targets at the node of Ranvier in demyelinating disorders. *Nat Rev Neurol*, 2015; 11: 143-56.

Stradleigh TW, Ishida AT. Fixation strategies for retinal immunohistochemistry. *Prog Retin Eye Res*, 2015; 48: 181-202.

Tam PK, Boyd GP. Origin, course, and endings of abnormal enteric nerve fibres in Hirschsprung's disease defined by whole-mount immunohistochemistry. *J Pediatr Surg*, 1990; 25: 457-61.

Teixeira AF, Wedel T, Krammer HJ, Kuhnel W. Structural differences of the enteric nervous system in the cattle forestomach revealed by whole mount immunohistochemistry. *Ann Anat*, 1998; 180: 393-400.

Uncini A, Kuwabara S. Nodopathies of the peripheral nerve: an emerging concept. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2015; 86: 1186-95.

Uncini A, Susuki K, Yuki N. Nodoparanodopathy: beyond the demyelinating and axonal classification in anti-ganglioside antibody-mediated neuropathies. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 2013; 124: 1928-34.

Weis J, Brandner S, Lammens M, Sommer C, Vallat J-M. Processing of nerve biopsies: A practical guide for neuropathologists. *Clinical Neuropathology*, 2012; 31: 7-23.

Wieczorek L. Nervenzupfpräparation (Nerve Fiber Teasing) in der Diagnostik peripherer Neuropathien beim Tier - Methodik und Interpretation- Tierärztliche Fakultät Ludwig-Maximilians-Universität, 2002.

Willison HJ. The translation of the pathological findings described in humans to experimental models of acute motor axonal neuropathy. *J Peripher Nerv Syst*, 2012; 17 Suppl 3: 3-8.

## **V GEMEINSAME DISKUSSION DER STUDIEN ZU KANINEN UND FELINEN IMMUN-MEDIERTEN POLYNEUROPATHIEN**

### **1 Methodische Grundlagen für eine verbesserte morphologische IMPN-Diagnostik**

Der erste Schritt auf dem Weg zu einer abgesicherten IMPN-Diagnose ist der Ausschluss einer Erkrankung des oberen motorischen Neurons. Die klinische Präsentation mit einer akuten, schnell voranschreitenden, meist symmetrischen, aufsteigenden Parese/Paralyse zusammen mit einer Hypo-/Areflexie entspricht einer Schädigung des unteren motorischen Neurons (HIRSCHVOGEL, 2012). Die klinische Diagnose kann im Folgenden funktionell durch elektrodiagnostische Untersuchungen und morphologisch durch die histopathologische Beurteilung von Muskel- und Nervenbiopsien abgesichert werden.

Unter Berücksichtigung aller in dieser Studie rekonstruierten und in der Fachliteratur kommunizierten Angaben lassen sich die klinischen und histopathologischen Hinweise auf eine IMPN auf die in Tabellen 2 und 3 aufgeführten Listen reduzieren. Voraussetzung hierbei ist immer das Vorliegen einer Dysfunktion des unteren motorischen Neurons.

**Tabelle 2. Einschätzung der diagnostischen Wertigkeit IMPN-typischer Veränderungen.**

Parameter	Wertigkeit	Einschränkung
Immunzellinfiltrate		
Faser-adhäsiv		
- heterotop	unterstützend	
- homotop	hinweisend	
Faser-invasiv		
- heterotop	hinweisend	
- homotop	beweisend	frühe Faserdegeneration
- homotop	hinweisend	fortgeschrittene Faserdegeneration
Makrophageale Infiltrate		
Faser-invasiv	hinweisend	Myelin-Stripping
Post-resorptiv	unterstützend	nahe demyelinisierter Fasern mit Onion Bulbs
Nodo-Paranodopathie (nicht-infiltrativ)		
akute Retraktion	beweisend	gewebegebundene AK
	hinweisend	multipel, kein AK-Nachweis
	unterstützend	oligofokal, kein AK-Nachweis
Interkalierende Internodien	hinweisend	seriell oder mit Onion Bulbs

Das histologische Schlüsselkriterium für eine immun-medierte Neuritis ist die lymphozytäre Infiltration von prä-degenerativen Nervenfasern mit und ohne Myelin-Stripping. Das Fehlen Faser-invasiver Immunzellen führt aber per se nicht zum Ausschluss einer IMPN, da die Zellen im früh-infiltrativen Stadium,

entsprechend IMPN-Subtyp 2a extrafokal liegen könnten, oder aber ein prä-infiltratives Stadium der IMPN vorliegen könnte.

**Tabelle 3. Einschätzung der diagnostischen Wertigkeit IMPN-typischer klinischer und labordiagnostischer Parameter.**

Parameter	Wertigkeit
Signalement	
Juvenile Rassekatze	hinweisend
Jagdhund (in Waschbär-Region)	unterstützend
Historie	
Akute Parese/-Paralyse Typ unteres motorisches Neuron	unterstützend
Waschbärbiss (Hd)	hinweisend
Impfung/Infektion 4-6 Wochen vor Krankheitsbeginn	hinweisend
Elektrophysiologie	
Radikuläre/proximale Leitungsstörung	hinweisend
Laboranalysen	
Positiver AGA-Nachweis	hinweisend
CSF - albuminozytologische Dissoziation	unterstützend
Negative Infektionstiter	unterstützend

Generell sollte bei der histopathologischen Diagnostik der Konfidenzbereich erkennbar werden. Die Wahrscheinlichkeit einer spezifischen

(ätiopathogenetischen) Diagnose spiegelt sich in der Einteilung „definitiv“, „wahrscheinlich“, „möglich“ oder auch „nicht ausgeschlossen“ wider. Die Kriterien für eine IMPN-Diagnose sind diesbezüglich in Tabelle 4 zusammengefasst.

Eine Whole-Mount-Immunhistochemie (WMI)-gestützte Untersuchung der in die Konfidenzbereiche „wahrscheinlich“ und „möglich“ eingeordneten Nervenbiopsien könnte hier eine weitere Absicherung und Unterstützung der Diagnose ermöglichen. Die NFZ ist dabei das wichtigste Hilfsmittel der histopathologischen Diagnostik. Nur sie ermöglicht eine gleichzeitige Detektion der infiltrierenden Immunzellen in Assoziation mit den Schädigungsbildern im Verlauf der Nervenfasern.

**Tabelle 4. Einfluss von Biopsie-Veränderungen und Hintergrunddaten auf die Validität einer möglichen IMPN-Diagnose**

Konfidenzbereiche	Kriterien
<b>Definitive IMPN</b>  <div>direkt</div>          <div>assistiert</div>	<div> A) Pure lymphozytäre Nodo-Paranodopathie entsprechend Subtyp 2 (alle Spezies, jedes Alter)  B) Früh-invasives Stadium der Schmidt-Lantermann-Einkerbung (SLK)-Form, entsprechend Subtyp 1, vor „Myelin-Breakdown“ (alle Spezies, jedes Alter) </div>          <div> C) Andere nodal-paranodal (NPN)-betonte Immunzell-Infiltrationen, entsprechend Subtyp 4,  a) Bei juvenilen reinrassigen Katzen  b) Bei Hunden mit akut einsetzender Symptomatik </div>          <div> D) Alle Faser-invasiven Typen, entsprechend Subtyp 1, 3, und 4, bei Hunden mit akut einsetzender Symptomatik nach beobachtetem Waschbärenbiss </div>
<b>Wahrscheinliche IMPN</b>	<div> A) Alle fortgeschrittenen immunzellulären Invasionstypen (entsprechend Subtyp 1, 2b, 3 und 4) mit Faserdegeneration, sofern eine der folgenden Situationen zutreffend:  a) Polyphasische (akute und chronische) Veränderungen mit subfaszikulären Clustern (siehe Abbildung 1)  b) Bei akut einsetzender Symptomatik + Hinweise auf vorangehender Infektion/Impfung (4-6 Wochen vor Einsetzen der Symptome) + erhöhtes CSF-Eiweiß + Ausschluss neurotroper Infektionen  c) Bei akut einsetzender Symptomatik + elektrophysiologische Hinweise auf Nervenwurzelschädigung + Ausschluss neurotroper Infektion  d) Serologischer AGA-Nachweis + Ausschluss neurotroper Infektion </div>          <div>oder</div>          <div> B) Prä-infiltrative Nodo-Paranodopathie (Dysmorphismus + </div>

	<p>akute Retraktion) sofern eine der folgenden Situationen zutreffend:</p> <p>a) Bei akut einsetzender Symptomatik + elektrophysiologischen Hinweisen auf Nervenwurzelschädigung + Ausschluss neurotroper Infektion</p> <p>b) Bei akut einsetzender Symptomatik + serologischem AGA-Nachweis + Ausschluss neurotroper Infektion</p> <p>oder</p> <p>C) Faser-adhäsive Immunzellen an typischen IMPN Lokalisationen, sofern akut einsetzende Symptomatik + elektrophysiologische Hinweise auf Nervenwurzelschädigung + juvenile Rassekatzen bzw. beobachteter Waschbärenbiss + serologischer AGA-Nachweis</p> <p>oder</p> <p>D) Faser-invasive Immunzellen mit diffuser Verteilung und fortgeschrittener Faserdegeneration, sofern akut einsetzende Symptomatik + juvenile Rassekatzen + Ausschluss neurotroper Infektion</p>
<p><b>Mögliche IMPN</b></p> <p>weil kompatible Veränderungen</p> <p>weil Ausschluss simulierender</p>	<p>A) Faser-adhäsive Immunzellen mit diffuser Verteilung sofern akut einsetzende Symptomatik + Hund mit Waschbären-Exposition und/oder serologischer AGA-Nachweis + Ausschluss neurotroper Infektion</p> <p>oder</p> <p>B) Faser-invasive Immunzellen bei fortgeschrittener Faserdegeneration sofern eine der folgenden Situationen zutreffend:</p> <p>c) Typisches Verteilungsmuster der Immunzellen</p> <p>oder</p> <p>d) Diffuses Verteilungsmuster der Immunzellen + elektrophysiologische Hinweise auf Nervenwurzelschädigung + Ausschluss neurotroper Infektionen</p>



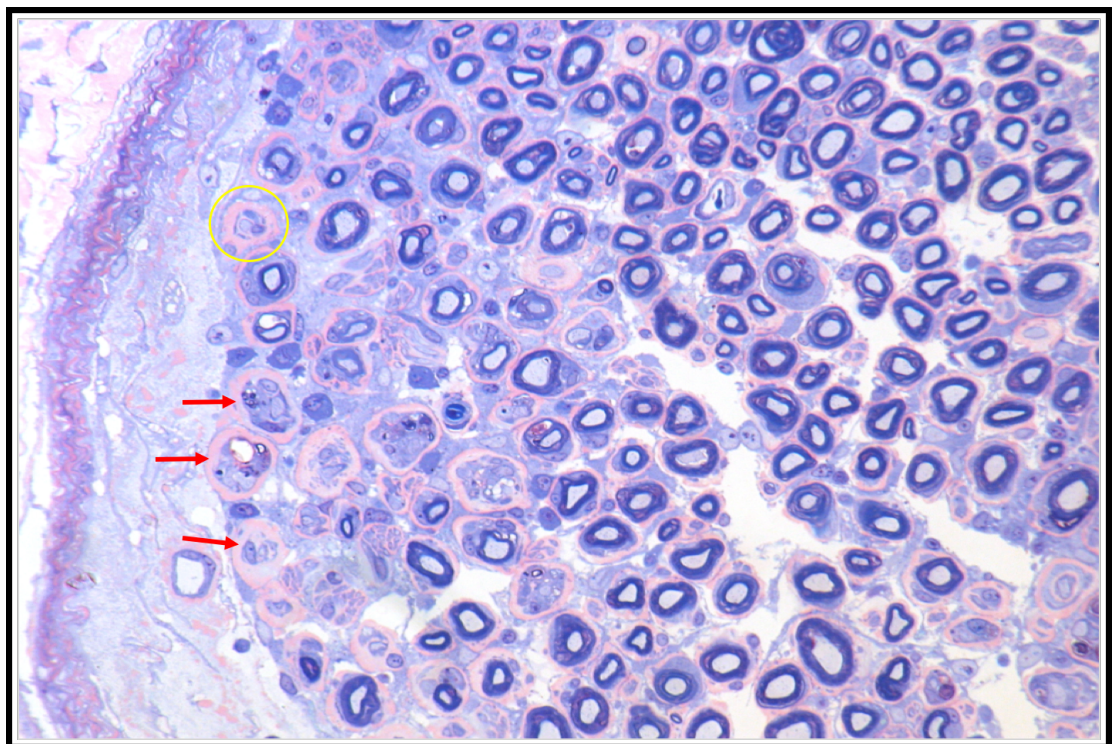
Neuropathien	<p>C) Keine morphologischen Veränderungen und Ausschluss anderer Nervenerkrankungen sowie</p> <p>a) Akut einsetzende Symptomatik + Juvenile Rassekatzen + Symptomatik nach Waschbärenbiss und/oder serologischer AGA-Nachweis</p>
--------------	---

Da IMPN-Verläufe mit schleichendem Beginn eine höhere Kortisonresponsivität zeigen, ist die zeitliche Zuordnung des Krankheitsverlaufs von entscheidender Bedeutung. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Klinik nicht immer die Gewebssituation widerspiegelt. Zum einen kann eine IMPN a priori chronisch ablaufen oder aber aus einer zunächst akuten Phase erwachsen. Im Gegenzug gibt es Berichte von akut aufflackernden IMPN-Situationen, denen eine schleichende subklinische Phase voranging. Außerdem müssen gemäß der Situation beim Menschen relapsierende Verläufe einkalkuliert werden. Im eigenen Patientenmaterial zeigten zwei Katzen ein Rezidiv.

Wichtig ist eine Abgrenzung von akuten IMPN zu aCIMP (MOLIN et al., 2011). Diese präsentieren sich klinisch und elektrodiagnostisch oft identisch mit akuten IMPN (MOLIN et al., 2011). Eine Unterscheidung kann hier nur durch eine histopathologische Untersuchung erreicht werden (MOLIN et al., 2011). Kriterien, die bei der Unterscheidung helfen, sind eine Differenzierung zwischen prä-infiltrativ/früh-infiltrativ/infiltrativ, zwischen aktiven/chronischen morphologischen Merkmalen und zwischen einer humoralen oder zellulären Beteiligung. Die WMI kann dazu beitragen, die klinische und immunbiologische Relevanz von histologischen Entzündungsanzeichen aufzuklären. Durch eine WMI-gestützte Untersuchung der Biopsieproben von Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen (akut, subakut, chronisch) kann eine Zuordnung der für die jeweiligen Phasen typischen zellulären und humoralen Akteure erfolgen.

Bei aktiven IMPN finden sich infiltrierende Immunzellen und/oder eine Ablagerung von Komplement/IgG, meist in Assoziation mit Läsionen, wie einer paranodalen Erweiterung. Eine humorale Betonung kann aber auch hinweisend auf eine attenuierende TH-2-Immunantwort und damit die Remissions-/Genesungsphase sein. Eine weitere Abgrenzung zu akuten IMPN ermöglicht

die Detektion von konzentrisch verdickten Endoneuralscheiden, subfaszikulären Clustern von de- und remyelinisierenden Fasern sowie Zwiebelschalen-artig angeordneten Schwannzellen, sogenannten „Onion Bulbs“, allesamt hinweisend auf einen chronischen Prozess (CUMMINGS & DE LAHUNTA, 1974a; MIZUNO et al., 1998; JOINT TASK FORCE OF THE EFNS AND THE PNS, 2005; HUGHES et al., 2006; MOLIN et al., 2011) (siehe Abbildung 1). Zusätzlich sind bei den aCIMPV häufiger remittierende oder relapsierende Verläufe anzutreffen, mit sowohl aktiven als auch chronischen Läsionen in den peripheren Nerven (CUMMINGS & DE LAHUNTA, 1974a, 1974b; BRAUND et al., 1996; MOLIN et al., 2011). Im Gegensatz zu akuten IMPV sprechen an aCIMPV erkrankte Hunde gut auf eine Therapie mit Kortison an (NORTHINGTON & BROWN, 1982; CUDDON, 1998; MOLIN et al., 2011).



**Abbildung 1.** Typische histopathologische Präsentation einer CIMPV mit verdickten Endoneuralscheiden (roter Pfeile) und remyelinisierenden Nervenfasern umgeben von Zwiebelschalen-artig angeordneten Schwannzellen (gelber Kreis).

Idealerweise sollten die Nervenbiopsien konventionelle histologische, d.h. fasermorphologische Untersuchungen mit dem geweblichen Nachweis spezifischer Entzündungsfaktoren kombinieren. Durch die unten angeführten Zusatzuntersuchungen könnten in Kürze spezifischere Krankheitsmarker für die

IMPN bei Hund und Katze zur Verfügung stehen, die insbesondere die Diagnose extrafokaler und prä-infiltrativer Immunreaktionen erleichtern würden.

## 2 Integrierte Klassifikation und Diagnose von IMPN

Eine integrierte diagnostische Annäherung an die IMPN und das GBS, unter Einbeziehung aller zur Verfügung stehenden diagnostischen Werkzeuge, ist entscheidend für eine schnelle und korrekte Diagnosefindung, das Einleiten adäquater Therapien und die Entwicklung neuer Therapien (CUDDON, 2002; FOKKE et al., 2014). Integriert bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Kombination aus klinischen, histopathologischen und elektrodiagnostischen Untersuchungsergebnissen sowie AGA/AGKA Profilen sich zu einem Gesamtbild der Erkrankung zusammenfügen sollen (ALLENBACH et al., 2017) (siehe Abbildung 2).

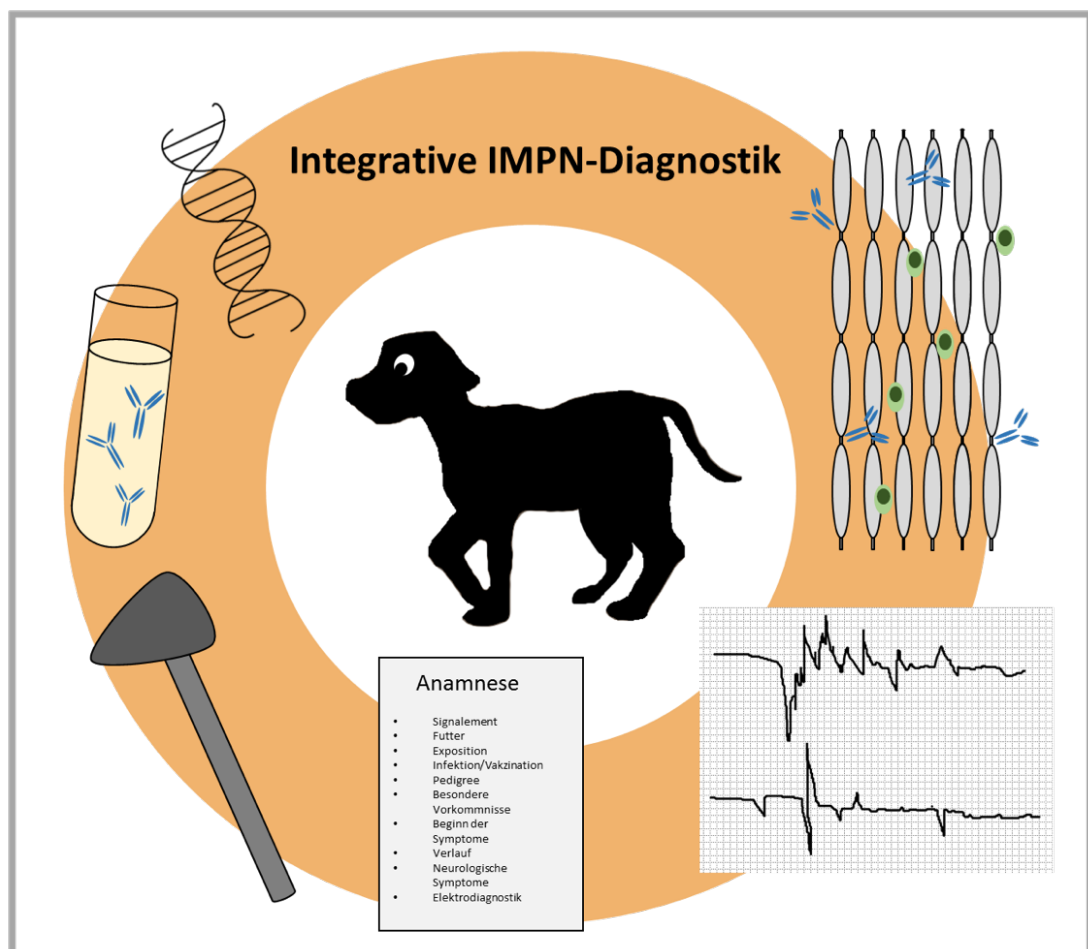


Abbildung 2. Bestandteile einer integrativen IMPN-Diagnostik.

Beispielsweise weisen elektrodiagnostisch axonal eingestufte GBS-Subtypen öfter einen Vorbericht mit einer gastrointestinalen Infektion auf, bei den Patienten können meist Anti-GM1-AGA detektiert werden, AMAN-Patienten weisen außerdem axolemmale IgG-Ablagerungen auf und oft wird bei diesen Patienten eine vorangehende *C. jejuni*-Infektion nachgewiesen (HO et al., 1995; REES et al., 1995; HAFER-MACKO et al., 1996a; HADDEN et al., 1998; VISSER et al., 1999). Bei Katzen gibt es für diese integrative Herangehensweise bislang zu wenige Daten. Bei Hunden mit Nachweis von Anti-GM2-AGA, abaxonaler GM2-Ablagerung auf der Schwannzellmembran und elektrodiagnostischen Untersuchungsergebnissen, die sowohl auf eine demyelinisierende als auch axonale Erkrankung hindeuten, erfolgte eine Einordnung als AIDP-konforme Erkrankung (RUPP et al., 2013). Bei zwei dieser Hunde wurde zudem eine vorangehende gastrointestinale Infektion vermerkt und auch bei den restlichen Anti-GM2-positiven Hunden wird eine *C. jejuni*-Infektion nicht ausgeschlossen (RUPP et al., 2013).

Für die diagnostische Aufarbeitung des GBS gibt es zwar mehrere Richtlinien, doch es gibt keine international einheitliche Richtlinie. Nichtsdestotrotz überschneiden sich die verschiedenen Richtlinien in den wichtigen Punkten und es werden mit den meisten Bewertungsschemata ähnliche Resultate erzielt (HADDEN et al., 1998). Es gibt aber auch hier immer wieder Versuche, einen gemeinsamen Nenner für alle Richtlinien, die im Gebrauch sind, zu finden. Eine Vereinheitlichung der Diagnoserichtlinien bedeutet eine sicherere Diagnosestellung für den Patienten, einen erleichterten Austausch zwischen unterschiedlichen Kliniken und eine gemeinsame Ausgangsbasis für Studien. Beispielsweise sind serielle elektrodiagnostische Untersuchungen momentan nicht in den Diagnoserichtlinien des GBS enthalten, diese würden aber eine korrekte Diagnosefindung unterstützen, da eine einzelne Untersuchung oft nicht aussagekräftig ist und zur Verwechslung zwischen einem klassischen demyelinisierenden Leitungsblock und dem RCF führen kann (KUWABARA et al., 1998; UNCINI & KUWABARA, 2012; UNCINI et al., 2013). Dies kann zu einer falschen Subtypisierung führen, die im Falle einer fälschlicherweise als axonal interpretierten Betroffenheit zu einer schlechteren Prognoseeinschätzung für den Patienten führt (UNCINI & KUWABARA, 2012).

Um diesem Problem auch bei kaninen/feline IMPN vorzubeugen, wäre es wünschenswert, für die klinische, elektrodiagnostische und histopathologische Beurteilung international gültige Richtlinien zu entwickeln. Für die kaninen und feline IMPN muss hierfür in weiteren prospektiven Studien genauer untersucht werden, welche elektrodiagnostischen Untersuchungsbefunde den histopathologischen Subtypen zuzuordnen sind. Auch in Bezug auf die klinische Präsentation sind weitere prospektive Studien notwendig, die Unterschiede im Verteilungsgrad und Ausprägung der Symptome im Hinblick auf die histopathologischen Subtypen klären.

Als Grundlage für eine gemeinsame anamnestische und klinische Vorgehensweise für die IMPN kann der in Teilstudie 1 vorgestellte Fragebogen herangezogen werden. Weitere Schritte, die hinsichtlich eines Konsens der diagnostischen Aufarbeitung dienlich wären, sind die Definition von einheitlichen elektrodiagnostischen Untersuchungskriterien und die Standardisierung und das Festlegen von Evaluationskriterien für Nervenbiopsien.

Auch beim GBS gibt es bis heute keine international gültige Richtlinie für die elektrodiagnostische Untersuchung (HADDEN et al., 1998; FOKKE et al., 2014). Durch das Fehlen eines Goldstandards für die Diagnostik lässt sich nicht eindeutig sagen, welche elektrodiagnostischen Beurteilungskriterien die höchste Gültigkeit für sich beanspruchen, daher bleibt nur eine Unterscheidung zwischen einer eher strikten oder eher toleranten Vorgehensweise (HADDEN et al., 1998). Dies führt zu einer differierenden Subtypisierung, wie sich auch in einer Studie zur elektrodiagnostischen Klassifikation von GBS-Patienten zeigte, von denen bei Verwendung der von dieser Forschergruppe modifizierten Kriterien 69 % der Patienten der AIDP zugeordnet wurden (HO et al., 1995; HADDEN et al., 1998), wohingegen bei Verwendung der durch eine niederländische Forschergruppe definierten Kriterien nur 56 % der Patienten als AIDP kategorisiert wurden (MEULSTEE & VAN DER MECHE, 1995; HADDEN et al., 1998). Der Zeitpunkt der elektrodiagnostischen Untersuchung spielt ebenfalls eine Rolle und sollte wenn möglich für serielle Untersuchungen bestimmte Zeitpunkte in die Ausarbeitung allgemeingültiger Richtlinien mit einbeziehen. Zusätzlich konzentrieren sich bislang die elektrodiagnostischen

Parameter beim GBS, der ACP und feline/kaninen IMPN auf eine Unterscheidung zwischen axonalen und demyelinisierenden Subtypen (CUDDON, 2002; GRANGER et al., 2008; RUPP et al., 2013; FOKKE et al., 2014).

Mit der in dieser Studie vorgeschlagenen Einteilung von feline und kaninen IMPN in Nodo-Paranodopathien und Internodopathien (hier insbesondere die Cleftopathien) müssen, wie auch beim GBS, die elektrodiagnostischen Parameter bezüglich ihrer Zuordnung zu den Subtypen reevaluiert werden (UNCINI & KUWABARA, 2012; FOKKE et al., 2014). Die demyelinisierenden Kriterien wurden in dieser Studie vor allem bei Subtyp 1 und Subtyp 2 vorgefunden, während axonale Parameter mit Nodo-Paranodopathien (Subtyp 2 und Subtyp 4) assoziiert waren. Dies bedarf einer weiteren Überprüfung in prospektiven Studien.

Für die akuten Nodo-Paranodopathien des GBS und in Abgrenzung zur AIDP wurden folgende elektrodiagnostische Kriterien, die durch serielle Untersuchungen bestätigt werden sollen, vorgeschlagen (UNCINI et al., 2013):

1. Leitungsblock oder eine reduzierte distale CMAP-Amplitude, die sich aber ohne temporale Dispersion wieder auflöst
2. Bei allen stimulierten Nerven wird ein Leitungsblock und niedrige CMAP-Amplitude festgestellt, aber ohne persistierende Anzeichen für eine Demyelinisierung
3. Bei frühen Untersuchungen wird eine niedrige CMAP-Amplitude festgestellt, die sich auch in den Folgeuntersuchungen nicht verändert
4. Das Vorhandensein einer geringgradigen Reduktion der Nervenleitgeschwindigkeit steht der Diagnose einer Nodo-Paranodopathie nicht entgegen

Ein Problem für das Zusammenfügen eines GBS-Gesamtbildes und eine Unterlegung der Subtypisierung mit histopathologischen, klinischen und elektrodiagnostischen Daten ist, dass meist keine Untersuchung von Nervenbiopsien stattfindet. Elektrodiagnostische Studien können zwar Hinweise geben, ob eher eine axonale Schädigung oder eine Betroffenheit der Myelinscheide vorliegt, diese müssen aber durch eine histopathologische

Untersuchung bestätigt oder revidiert werden (HADDEN et al., 1998). Für eine definitive Subtypisierung fehlen bislang prospektive Studien, die sowohl die elektrodiagnostischen als auch die histopathologischen Ergebnisse in die Subtypisierung mit eingliedern sowie durch die Identifikation von Biomarkern ergänzen. Wie schon bei der Elektrodiagnostik beschrieben, gibt es auch für die Durchführung und Evaluation von Nervenbiopsien keine international gültigen Richtlinien (SOMMER et al., 2010). Nur in den seltensten Fällen liegen Nervenbiopsien zum Vergleich mit den übrigen diagnostischen Ergebnissen vor, da sie nicht zum Standardprozedere für die Aufarbeitung gehören und meist der letzte Schritt einer diagnostischen Abklärung sind (SOMMER et al., 2008; SOMMER et al., 2010). Begründet wird dies durch den invasiven Charakter und die Zeit- und Kostenintensität von Nervenbiopsien (SOMMER et al., 2010). Dies gilt für die Nervenbiopsien im Allgemeinen und für NFZ im Besonderen, für die zwar der diagnostische Vorteil anerkannt wird, dieser aber nicht mit den hohen Kosten zu rechtfertigen sei (SOMMER et al., 2010). Zugleich gibt es keine evidenzbasierten Studien für eine Beurteilung der Einsatzmöglichkeiten und Validität von Nervenbiopsien, hier auch im Zusammenhang mit spezifischen Erkrankungen (SOMMER et al., 2010). Überdies fehlen prospektive Studien, die einen prozentualen Vergleich zwischen einer elektrodiagnostisch unauffälligen Untersuchung zu einer positiv befundeten Nervenbiopsie ziehen und damit die Wertigkeit einer Biopsieentnahme untersuchen (SOMMER et al., 2010). Gleichzeitig gilt zu überprüfen, ob es möglich ist, durch den Einsatz von bildgebenden Verfahren wie der Magnetresonanztomographie oder einer Ultraschalluntersuchung geeignete Biopsiestellen im Vorfeld zu identifizieren und so die diagnostische Sensitivität zu erhöhen (SOMMER et al., 2010).

Ein Punkt, der für die Validierung von Nervenbiopsien oft vernachlässigt wird ist, dass trotz jahrzehntelanger Forschung und Versuchen, die Ätiopathogenese zu ergründen, bis heute die Zielantigene nur unzureichend identifiziert wurden. Je mehr Daten über eine Erkrankung vorliegen, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, der Ursache auf den Grund zu kommen. Im Falle des GBS und den IMPN ist anzustreben, die Daten aus klinischen, histopathologischen, WMI-Untersuchungen, elektrodiagnostischen Untersuchungen und der Liquoranalyse zu kombinieren und den jeweiligen Subtypen zuzuordnen. Hieraus ergeben sich neue Möglichkeiten hinsichtlich der Erforschung der

Zielantigene, der Zuordnung von Charakteristika für die jeweiligen Subtypen, der Definition von Biomarkern und der Entwicklung von neuen Ansatzpunkten für Therapien.

Für die Auswahl einer Nervenbiopsie eignen sich diejenigen Abschnitte, die klinisch und elektrodiagnostisch betroffen sind (SOMMER et al., 2010). Eine Nervenbiopsie kann entscheidende Einblicke in die Immunantwort und Schädigungsmechanismen liefern. Bei Hunden konnte eine Ablagerung von Anti-GM2-AGA an der abaxonalen Schwannzellmembran von geteasten Nervenfasern nachgewiesen werden (RUPP et al., 2013). Diese Untersuchungen ermöglichen eine Korrelation der Immunantwort mit den verursachten Läsionen im peripheren Nerven und unterstützen so die Eingrenzung möglicher Zielantigene. Darüber hinaus konnte durch die Detektion von Anti-GM2-AGA eine weitere Verbindung zum GBS hergestellt werden (KANNAN et al., 2011; RUPP et al., 2013).

Bei der Entnahme einer Nervenbiopsie sollte die Manipulation des Nerven auf ein Minimum beschränkt werden und insbesondere eine Dehnung und Kompression vermieden werden (SOMMER et al., 2010). Der entnommene Nerv sollte mindestens eine Länge von 10 mm haben, um eine NFZ, WMI, Praffinschnitte und Semidünnschnitte anfertigen zu können. Je nach Ausstattung der Klinik oder abhängig von der Fragestellung kann die Nervenbiopsie unfixiert und in feuchte Gaze gewickelt oder Formalin-fixiert verschickt werden. Eine Evaluierung sollte durch Spezialisten mit mehrjähriger Erfahrung in der neuromuskulären Diagnostik durchgeführt werden (SOMMER et al., 2008). Zusätzlich sollten alle zur Verfügung stehenden Berichte und Untersuchungsergebnisse aus der Klinik (siehe Fragebogen aus Teilstudie I) vorliegen.



### **3 Vergleich der feline und kaninen IMPN Subtypen mit bestehenden GBS-Tiermodellen**

Feline und kanine IMPN bieten die Möglichkeit, als spontane Tiermodelle für das GBS eingesetzt zu werden und wertvolle Erkenntnisse besonders im Hinblick auf die Krankheitsentstehung, die Wirkungsweise und Effizienz neuer Therapien zu liefern. Eine Evaluation der Validität als Tiermodell erfolgt durch eine Begutachtung der ätiologischen Validität, der Augenscheinvalidität und der prognostischen Validität (POTSCHKA et al., 2013) (Abbildung 3). Die ätiologische Validität steht für das Ausmaß der an IMPN erkrankten Hunde und Katzen, deren Symptome auf die gleiche Ursache wie bei GBS-Patienten zurückzuführen sind. Die Augenscheinvalidität dient zur Überprüfung der Ähnlichkeit von klinischen Symptomen und histopathologischen Veränderungen zwischen IMPN und GBS. Die prognostische Validität gibt an, ob das Ansprechen auf eine Therapie derjenigen von GBS-Patienten entspricht. IMPN erscheinen aufgrund von Analogien in der Ätiopathogenese, der klinischen Präsentation, Krankheitsbeginn und -progression und dem Ansprechen auf therapeutische Maßnahmen besonders geeignet für eine Verwendung als Tiermodell. Im Folgenden sollen die kaninen und feline IMPN mit bereits etablierten Tiermodellen sowie den bislang bei Hunden und Katzen beschriebenen, zu einer akuten schlaffen Tetraparese/-paralyse führenden akuten immun-medierte Neuropathien verglichen werden. Zusätzlich ist es wichtig, weitere Studien für die Identifizierung der beteiligten zellulären und humoralen Akteure durchzuführen sowie ätiologische Konzepte zu entwickeln und zu überprüfen, letztendlich auch im Hinblick auf eine Kongruenz zwischen feline/kaninen IMPN und dem GBS.

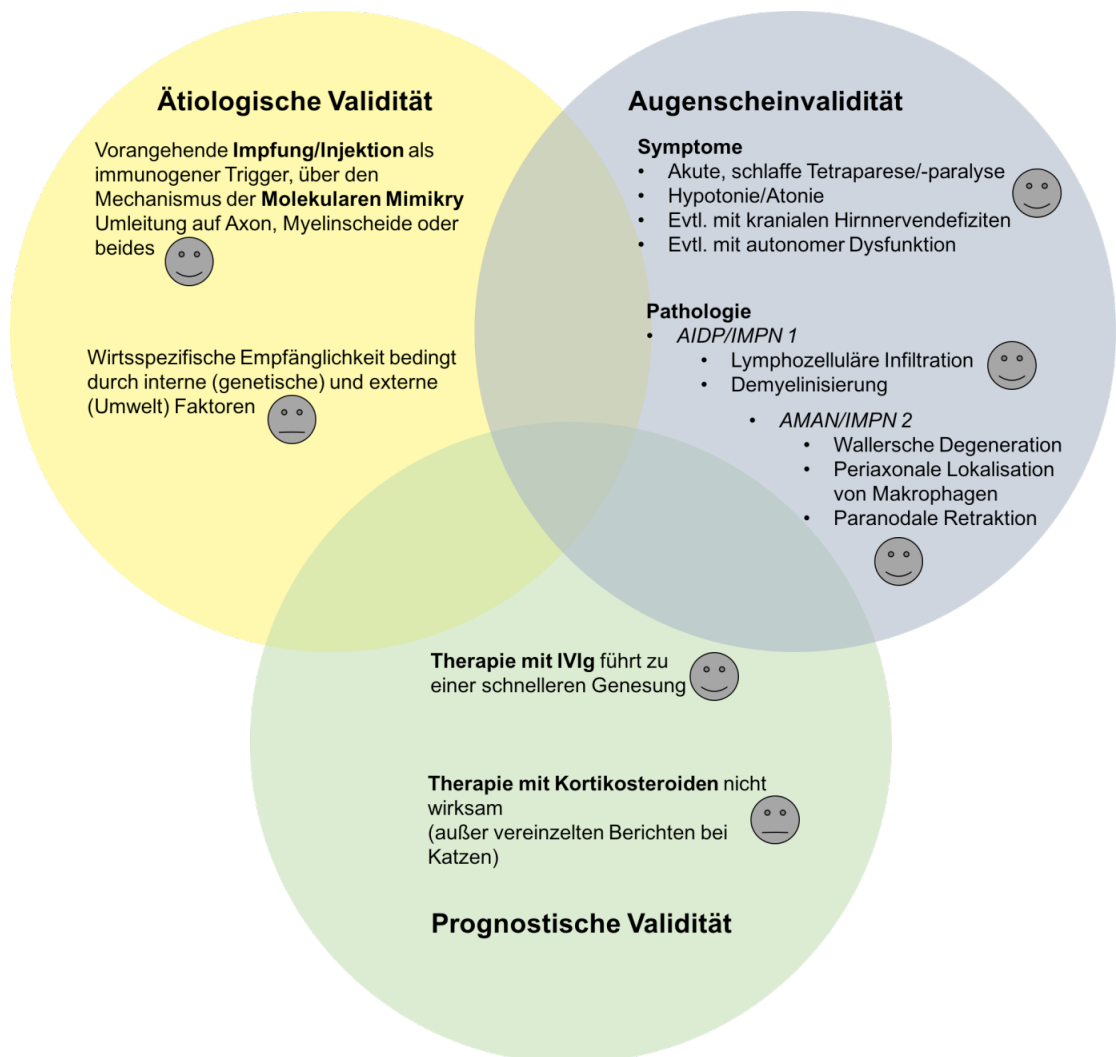


Abbildung 3. Darstellung der Evaluationskriterien für Tiermodelle, modifiziert nach (POTSCHKA et al., 2013).

### 3.1 EAN – das klassische GBS-Tiermodell

Der erste augenscheinliche Vorteil der hier vorgestellten kaninen und feline IMPN ist, dass es sich im Gegensatz zur EAN um spontane Tiermodelle handelt. Wie auch für das GBS beschrieben, wird für die IMPN eine Aktivierung des Immunsystems durch immunogene Trigger mit nachfolgender Umlenkung der Immunantwort auf körpereigene Strukturen angenommen. Im Gegensatz hierzu werden bei der EAN Trigger injiziert, die beim GBS erst als sekundäre Zielstrukturen eine Rolle spielen und somit nicht das Prinzip der molekularen Mimikry wiedergeben. Oftmals schwierig gestaltet sich zudem sowohl bei der aktiven als auch der passiven Immunisierung das Erreichen eines reproduzierbaren Krankheitsbildes mit konstanten pathologischen

Veränderungen, die denen des GBS entsprechen (WILLISON, 2012). Des Öfteren kommt es bei der EAN auch zu einem Einbezug des ZNS, wie beispielsweise bei der Verwendung von myelin-assoziiertem Glykoprotein und PMP22, die sowohl im PNS als auch im ZNS vorkommen (SOLIVEN, 2012). Defizite die das ZNS betreffen sind beim klassischen GBS nur äußerst selten vorzufinden, was wiederum das Heranziehen als Tiermodell erschwert (GOLD et al., 2000; BADER et al., 2010). Zudem wurde bis jetzt keine autoreaktive T-Zellantwort in GBS-Patienten nachgewiesen und die bei der EAN verwendeten Antigene werden bei der natürlichen Krankheitsentstehung erst sekundär angesteuert, was wiederum unterstreicht, dass hier nicht die natürliche Entwicklung widerspiegelt wird (BADER et al., 2010; SHAHRIZAILA & YUKI, 2011; NYATI et al., 2012). Dahingegen wurden durch die Entdeckung von Anti-GM2-AGA bei Hunden bereits erste Kongruenzen der Immunantwort zum GBS nachgewiesen (RUPP et al., 2013).

### **3.2 AIDP- und AMAN-Tiermodelle in Hühnern**

Die AvIDP wurde als spontanes Tiermodell für die AIDP vorgeschlagen. Klinisch und histopathologisch präsentieren sich die AvIDP und das GBS sehr ähnlich (BADER et al., 2010). Auch für die AMAN gibt es durch *C. jejuni*-induzierte spontane und experimentelle Tiermodelle in Hühnern. Allen Hühnermodellen gemein ist die Krankheitsentwicklung durch den Mechanismus der molekularen Mimikry. Zusätzlich konnte bei der AvIDP der beim Menschen zu einer Abschwächung von Symptomen und Einleitung der Remission/Genesung führende TH-1 zu TH-2 Shift nachgezeichnet werden (BADER et al., 2010; ZHANG et al., 2013). Diesen immunbiologischen Gemeinsamkeiten entgegengesetzt ist die im Vergleich zu kaninen und feline IMPN größere Speziesdistanz zwischen Mensch und Huhn.

### **3.3 AMAN-Tiermodell in Kaninchen**

Durch eine GM1-Injektion wird eine akute, schlaffe Paralyse in Kaninchen induziert und dient als axonales GBS-Tiermodell. Histopathologisch überwiegt eine Wallersche Degeneration und es konnte eine Titererhöhung von Anti-GM1 zusammen mit axonalen IgG-Ablagerungen, wie auch schon für AMAN-Patienten gezeigt, nachgewiesen werden (HAFFER-MACKO et al., 1996a; YUKI

et al., 2001). Im Gegensatz hierzu finden sich bei der ACP und der AIDP internodale IgG- und Komplement-Ablagerungen (HAFFER-MACKO et al., 1996b; RUPP et al., 2013). Die Klärung des Vorkommens und die Identifizierung von kaninen und feline AGA/AGKA benötigt weitere Studien, besonders auch im Hinblick auf eine Assoziation mit bestimmten Subtypen. Nichtsdestotrotz handelt es sich bei der CHP, ACP und den in dieser Studie beschriebenen IMPN-Fällen um spontane Tiermodelle, die im Hinblick auf eine Erforschung der Ätiopathogenese entscheidende Vorteile bieten.

### **3.4 CHP, ACP und kanine/feline IMPN – neue Möglichkeiten für spontane, spezie-nahe Tiermodelle**

Das klinische Bild entspricht bei der CHP, ACP und den IMPN-Fällen dem des GBS (CUMMINGS & HAAS, 1972; LANE & DE LAHUNTA, 1984; MALIK et al., 1991; GERRITSEN et al., 1996; CUDDON, 2002; RUPP et al., 2013). Sensorische Defizite sind wie auch bei beim GBS selten und betreffen dann vor allem den AMSAN-Subtyp, der auch bei Hunden und Katzen beschrieben wurde (CUMMINGS & HAAS, 1972; PORTER et al., 2002; FUNAMOTO et al., 2007; GUTIERREZ-QUINTANA et al., 2015). Ebenfalls rar sind kraniale Nervendefizite und zeigen sich meist durch eine Fazialisparese, einen reduzierten Lidreflex, eine reduzierte Drohreaktion oder einer Larynxparese (CUMMINGS & HAAS, 1966; GERRITSEN et al., 1996; CUDDON, 2002). Bei den in diese Studie inkludierten Hunden und Katzen zeigten jeweils nur vier von 34 eine Beeinträchtigung der kranialen Nerven. Ein Unterschied zwischen CHP, ACP, IMPN und GBS ist die bei Hunden und Katzen verkürzte progressive Phase von 5-10 Tagen im Vergleich zu bis zu vier Wochen beim Menschen (WINER, 2001; CUDDON, 2002; GRANGER et al., 2008; RUPP et al., 2013).

Bezüglich der klinischen Vorgeschichte wurde besonderes Augenmerk auf Impfungen und Infektionen in einem Zeitraum von bis zu sechs Wochen vor dem Auftreten der klinischen Symptome gelegt. Es wird angenommen, dass eine Immunstimulation durch Vakzination oder Infektion (HUGHES & CORNBLETH, 2005) beim GBS zu einer fehlgeleiteten Immunantwort gegen körpereigene Bestandteile führen kann. Auch bei Hunden und Katzen gibt es beschriebene Zusammenhänge zwischen Infektion oder Impfung und

Entwicklung einer ACP/IMP (CHETBOUL, 1989; CHRISMAN, 2000; GEHRING & EGGARS, 2001; CUDDON, 2002). Bei Hunden mit Anti-GM2-Nachweis wurde in zwei Fällen eine vorangehende gastrointestinale Infektion festgestellt (RUPP et al., 2013). Von den in der IMPN-Studie beteiligten Hunden litt ein Hund eine Woche vor IMPN-Beginn an einer Enteritis. Des Weiteren wurden ein Hund und zwei Katzen in einem Zeitraum von bis zu sechs Wochen vor Krankheitsbeginn geimpft. Bei der CHP geht die Inokulation von Waschbärenspeichel voraus (CUMMINGS & HAAS, 1966). Der beim Menschen beschriebene Zusammenhang zwischen einer *C. jejuni* Infektion und der Ausbildung einer AMAN (JACOBS et al., 1996; HO et al., 1999; WILLISON et al., 2016) wurde bislang bei feline und kaninen Patienten nicht nachgewiesen.

Weitere Kongruenzen zwischen dem GBS und der ACP konnte durch Auftragen von kaninem GM2-reaktivem Serum und monoklonalem Maus Anti-GM2-AGA auf sowohl kanine als auch murine Nervenfasern gezeigt werden, mit nachfolgender AGA-Ablagerung auf der äußeren Schwannzellmembran (RUPP et al., 2013). Beim Menschen besteht für Anti-GM2 keine Zuordnung zu einem bestimmten Subtyp, jedoch kommen AGA insgesamt vermehrt bei der axonalen Form vor (KANNAN et al., 2011). Bei Hunden mit Anti-GM2-AGA wird aufgrund der abaxonalen Ablagerung auf der Schwannzelloberfläche mit nachfolgender Komplementaktivierung von einem demyelinisierenden Subtyp ausgegangen (RUPP et al., 2013). Diese Beobachtungen erfordern weitere Studien im Hinblick auf eine Beteiligung von AGA/AGKA an der Ätiopathogenese, der immunologischen Konsequenz und dem Zusammenhang zwischen AGA/AGKA und einem bestimmten Subtyp bei Hunden und Katzen.

Aufgrund von histopathologischen und elektrodiagnostischen Befunden wurde die ACP sowohl als Modell für die AIDP, als auch für die AMAN vorgeschlagen (CUDDON, 1998; HOLT et al., 2011; RUPP et al., 2013; STANCIU et al., 2014; STANCIU & SOLCAN, 2016). Bei einem direkten Vergleich der IMPN mit den GBS-Subtypen weisen die AMAN-Beschreibungen in der Literatur Ähnlichkeiten mit dem Subtyp 2 auf. Charakteristisch für Subtyp 2 ist die Betonung der NPN-Region, mit einem früh-infiltrativen Typ 2a und einem infiltrativen Typ 2b. Die Anzahl an beteiligten Entzündungszellen scheint bei der AMAN im Gegensatz zur AIDP geringer und vor allem periaxonal lokalisiert zu

sein (HAFER-MACKO et al., 1996a). Subtyp 2a weist nur eine geringe Zahl an Entzündungszellen auf, mit teilweise fulminanten dysmorphen Paranodien und paranodaler Retraktion. Paranodale Retraktionen kommen auch bei AMAN Patienten vor (HAFER-MACKO et al., 1996a). Um eine exakte Übereinstimmung überprüfen zu können, müssten GBS- und IMPN-Fälle derselben temporalen Entwicklungsstufe miteinander verglichen werden. Bei den untersuchten GBS-Fällen handelt es sich entweder um sehr frühe oder bereits weit fortgeschrittene Stadien. Bei den IMPN-Biopsien bedarf es für die stadiale Einordnung noch einer genaueren Untersuchung und Bestimmung der beteiligten Immunfaktoren, AGA/AGKA und Phänotypisierung der Entzündungszellen.

Die zwiespältige Einordnung der CHP und ACP spiegelt sich auch in der histopathologischen Untersuchung wider. Problematisch ist hier, dass eine klare Differenzierung zwischen einer primären axonalen/demyelinisierenden Erkrankung oftmals schwierig ist, insbesondere wenn die Veränderungen schon weit fortgeschritten sind (CUMMINGS & HAAS, 1966; CUDDON, 2002). Eine axonale Degeneration scheint dennoch ein häufigerer Befund bei der ACP und CHP im Vergleich zum GBS zu sein (CUMMINGS & HAAS, 1966; CUMMINGS et al., 1982; CUDDON, 2002; STANCIU & SOLCAN, 2016). Bei den wenigen veröffentlichten histopathologischen Berichten zu feline IMPN werden sowohl axonale Veränderungen als auch Demyelinisierungen beschrieben, wohingegen die elektrodiagnostischen Ergebnisse oft auf eine vorwiegend axonale Form hinweisen (GERRITSEN et al., 1996; GRANGER et al., 2008; JEANDEL et al., 2015). Die Betonung der NPN-Region lässt sich auch mit einer Einordnung von neun kaninen IMPN Fällen zu Subtyp 2 und acht feline zu Subtyp 2b und Subtyp 4 erkennen. Das Auffinden von sowohl axonaler Degeneration als auch segmentaler Demyelinisierung mit Entzündungszellinvasion lässt zum einen vermuten, dass auch bei der CHP, ACP und bislang beschriebenen feline IMPN, ebenso wie bei den hier in der Studie beschriebenen Fällen und dem GBS, verschiedene Subtypen vorliegen. Das Dilemma, das eine Kategorisierung in axonal/demyelinisierend mit sich zu bringen scheint, kann durch die in dieser Studie vorgeschlagene IMPN-Subtypisierung, mit Betonung der jeweils involvierten Kompartimente und Zielantigene, gelöst werden. Demnach könnten im Falle der CHP/ACP sowohl

der Subtyp 1, mit internodalem Schwerpunkt und Demyelinisierung, aber auch die NPN-betonten Subtypen 2a und Subtyp 2b vorkommen. Bei den in dieser Studie untersuchten Hunden wurde in den meisten Fällen eine NPN-Betonung festgestellt, gefolgt von dem „Cleftopathie“-Typ (Subtyp 1). Zusätzlich denkbar ist, dass einige CHP und ACP Fälle dem gemischten Subtyp 3 zuzuordnen sind, der möglicherweise durch eine duale Immunattacke von Zielantigenen in Myelinscheide und Axon entsteht. Eine andere Erklärung wäre eine Ansteuerung von zusätzlichen Antigenen im Verlauf der Erkrankung („Antigen Spreading“). Die in dieser Studie inkludierten Katzen präsentierten sich meist mit gemischten Typen, den IMPN-Subtypen 3 und 4. Insgesamt scheint auch bei Katzen eine Konzentration auf die NPN-Region vorzuliegen, da sieben Katzen den Subtyp 4 aufwiesen und eine Katze als Subtyp 2b kategorisiert wurde.

Aufgrund der elektrodiagnostischen Untersuchungsergebnisse erfolgte oft eine axonale Einordnung der CHP, ACP und feline IMPN-Fälle (NORTHINGTON & BROWN, 1982; CUDDON, 1994, 1998, 2002; GRANGER et al., 2008; JEANDEL et al., 2015). Zudem wies die Elektromyografie Denervationsmerkmale auf, die auf eine axonale Schädigung hinweisen (CUMMINGS & HAAS, 1966; CUDDON, 1998; GRANGER et al., 2008; JEANDEL et al., 2015). Die bei einigen Tieren reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit, die erhöhte F-Ratio und die verlängerte F-Wellen-Latenz sprechen wiederum für eine demyelinisierende Erkrankung. Ein generelles Problem, wie auch in der Humanmedizin, ist, dass sequentielle elektrodiagnostische Untersuchungen meist nicht durchgeführt werden und die Einzeluntersuchungen das primäre Ziel der Immunattacke oft nicht erfassen (UNCINI et al., 2013). In dieser Studie wurden zwei Hunde und eine Katze, die histopathologisch als Subtyp 1 kategorisiert wurden, elektrodiagnostisch als axonal eingestuft. Umgekehrt zeigten zwei Hunde mit NPN-Betonung in der elektrodiagnostischen Untersuchung demyelinisierende Veränderungen. Aus diesen Gründen werden beim GBS elektrodiagnostische Folgeuntersuchungen empfohlen, da sich primär demyelinisierende Subtypen axonal präsentieren können und andersherum ebenso (UNCINI et al., 2013).

## **4 IMPN-spezifischer Einsatz der WMI**

Die WMI von NFZ kann einen wertvollen Beitrag zur Phänotypisierung der Immunzellen und Detektion von AGA/AGKA leisten. Im Hinblick auf klinische Manifestation, Prognose, Chronizität und dem Abwägen der möglichen Therapievarianten ist es unumgänglich, die beteiligten Akteure zu identifizieren, um so bestmöglich reagieren zu können.

Ähnlich des GBS zeigen die Langzeituntersuchungen der felines/kaninen IMPN remittierende, relapsierende und monophasisch-progressive Verläufe (GERRITSEN et al., 1996; CUDDON, 2002; GRANGER et al., 2008; MOLIN et al., 2011). Bei Mensch, Versuchstier und Huhn werden Besserungen des Krankheitsbildes mit einer Umschwenkung von zellulären auf humorale Immunmechanismen in Zusammenhang gebracht (BADER et al., 2010; ZHANG et al., 2013). Aus diesem Grund ist eine temporale Einordnung der Nervenbiopsien von entscheidender Bedeutung im Hinblick auf eine stadiale Zuordnung der Immunantwort für die einzelnen IMPN-Phasen.

Die für diagnostische Zwecke eingesendeten Nervenproben umfassen oftmals nur wenig Material. Ein Vorteil der WMI ist die exakte Abtrennung der für die jeweilige Untersuchung benötigten Nervenfasern, was wiederum eine effektive Aufarbeitung, auch von kleinen Nervenfaserbiopsien, ermöglicht. Die Vergleichbarkeit der felines/kaninen IMPN mit dem GBS bedarf der näheren Hinterfragung der progressiven versus attenuierenden Faktoren.

### **4.1 Detektion von Immunzellen durch die WMI**

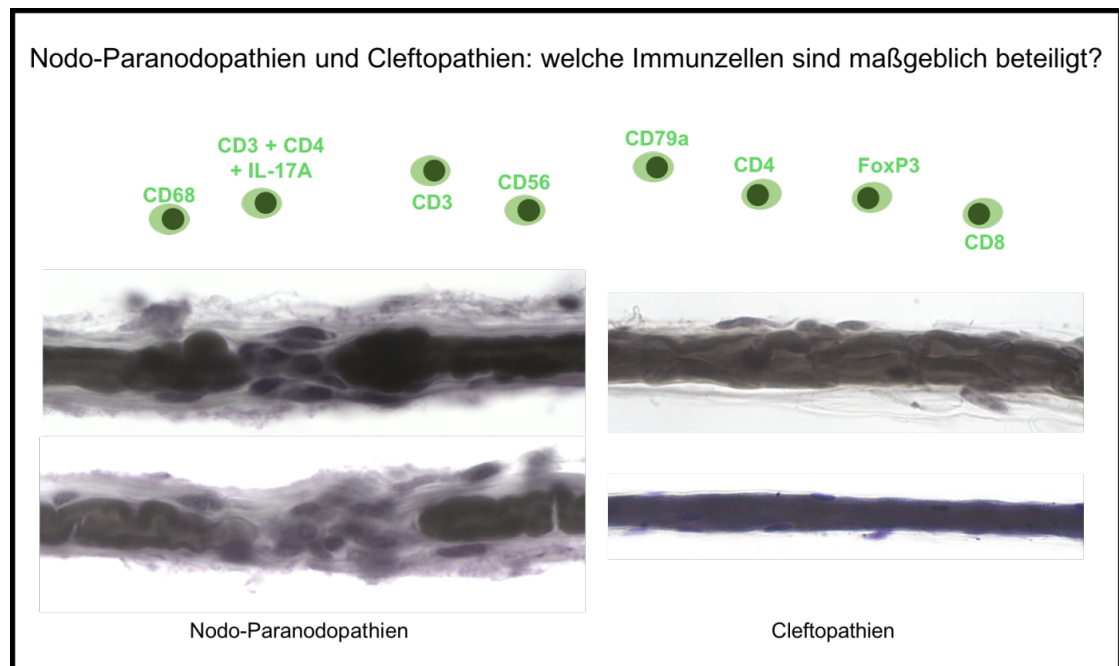
Gestützt auf das Modell der EAN wurde bislang vor allem eine TH-Zelldominanz in der Krankheitsentstehung des GBS angenommen (ZHANG et al., 2013). Sie locken sowohl Makrophagen an den Ort des Geschehens, die zu einer Schädigung der Nervenfasern führen, und zusätzlich unterstützen sie auch B-Zellen in der IgG-Bildung (YANG et al., 2015). Diesen indirekt wirkenden Akteuren stehen CTL gegenüber, die die Nervenfasern direkt schädigen (YANG et al., 2015).

Durch die Identifizierung der beteiligten Entzündungszellen können Rückschlüsse auf das vorherrschende Stadium der Immunantwort getroffen



werden. Für eine korrekte stadiale Einordnung werden außerdem auch noch Zytokinprofile benötigt, die über eine quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) der jeweiligen Nervenbiopsien bestimmt werden können (BADER et al., 2010). Der akute Schub des GBS ist durch eine hohe Konzentration an IL-12 gekennzeichnet, die die Differenzierung zu TH-1 stimuliert. Zusätzlich bewirken die TH-1-Zytokine  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{INF-}\gamma$  und IL-12 die Aktivierung der Makrophagen mit anschließendem Myelin-Stripping (ZHANG et al., 2011). Demnach wäre in der akuten Phase der IMPN vor allem mit einer Detektion von Makrophagen und TH-1 zu rechnen, die nun durch die WMI und RT-PCR sowohl temporal als auch lokal zugeordnet werden können. Bei Vorliegen eines IL-4-Milieus erfolgt eine zunehmende Proliferation von TH-2 mit Einstieg in die humoral-vermittelte Remissionsphase, die bestenfalls zu einer Genesung führt (ZHANG et al., 2013). IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, die den TH-2 entstammen, resultieren in einer B-Zell-Aktivierung, einem Ig-Wechsel von IgM zu IgG und einer Herabregulation der Makrophagen-Aktivität (ZHANG et al., 2013). Das heißt, dass in diesem Stadium bei einer WMI-Untersuchung vermutlich eher B-Zellen und TH-2 und kaum Makrophagen vorzufinden wären.

Bei den in Teilstudie I beschriebenen IMPN-Subtypen wäre zuallererst eine Unterscheidung zwischen B- und T-Zellen anzustreben, mit einer nachfolgenden Differenzierung in TH, CTL oder  $T_{\text{REGS}}$ . Wenn diese grundlegende Unterscheidung erfolgt ist, können weitere Differenzierungen der TH-Untergruppen erfolgen. Bei Subtyp 1 wäre zu überprüfen, ob T-Zellen maßgeblich an der Ätiopathogenese beteiligt sind, oder ob doch eine bislang unterschätzte humorale Beteiligung eine Rolle spielt. Besonders interessant sind auch die Subtypen 2b, 3 und 4. Bei Subtyp 2b wäre über eine TH-1/TH-2/TH-17 Bestimmung zu überprüfen, ob dies bereits das attenuierende Stadium zu Subtyp 2a ist. Subtyp 3 sollte dahingehend näher hinterleuchtet werden, ob es sich um eine Ansteuerung von Antigenen im Bereich der Myelinscheide und des Axons handelt, oder ob sich dieser Subtyp aus den „puren“ IMPN-Subtypen (1,2) durch Antigen-Spreading entwickelt. Auch hier könnte die stadiale Einordnung durch eine Untersuchung der Lymphozytensubpopulationen neue Erkenntnisse liefern. Ähnlich ist die Fragestellung bei Subtyp 4. Denkbar wäre eine Entwicklung über 2a, 2b zu 4.



**Abbildung 4. Zelluläre Krankheitsstadien in Nodoparanoopathien und Cleftopathien mit Vorschlägen für eine Phänotypisierung der beteiligten Immunzellen.**

Eine je nach Subtyp unterschiedliche Beteiligung des Immunsystems wurde bei der AIDP und der AMAN bereits nachgewiesen. Auch wenn sich AMAN und AIDP in der Klinik ähnlich darstellen, liegen ihnen doch unterschiedliche pathologische Schädigungsmuster zugrunde, mit einer unterschiedlichen Beteiligung von Immunzellen, Antikörpern und Zytokinen. So spielen zum Beispiel IL-12 und TNF- $\alpha$  eine ganz unterschiedliche Rolle in der Pathogenese von AIDP und AMAN (DENG et al., 2008). Bei der AIDP ist z. B. in der Akutphase IL-12 wirksam, während bei der AMAN TNF- $\alpha$  eine Schlüsselrolle spielt (DENG et al., 2008). Dieser findet sich wiederum bei der AIDP zusammen mit dem Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1 (TNFR1) vor allem in der nicht-progressiven Plateauphase und kann durch eine IVIg-Therapie herabreguliert werden (DENG et al., 2008). Dahingegen erfolgt bei der AMAN eine Hochregulierung von TNF- $\alpha$  und Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 2 (TNFR2) durch die IVIg-Therapie (DENG et al., 2008). Durch das Vorkommen von IL-12, mit einer Initiation und dem Unterhalt einer TH-1 Immunantwort, in der akuten Phase der AIDP wird die eher zellulär vermutete Ätiopathogenese betont (DENG et al., 2008). Auch bei den kaninen und feline IMPN muss in Folgestudien eine genaue Differenzierung und Zuordnung der Immunzellen und

Zytokine zu den jeweiligen Phasen erfolgen. Die IMPN-Subtypisierung mit ihren eindeutig zuzuordnenden pathologischen Schädigungsbildern eignet sich hervorragend, um die beteiligten Akteure der Immunantwort zu identifizieren und zu lokalisieren, um so auch ätiopathogenetische Rückschlüsse ziehen zu können.

Interessant bei den kaninen/feline IMPN wäre auch eine Überprüfung der Therapieauswirkungen durch eine WMI. Eine Studie bei AMAN- und AIDP-Patienten hat das Vorkommen der Lymphozytensubpopulation vor und nach einer Therapie mit IVIg untersucht (HOU et al., 2014). Bei der AIDP konnte eine höhere Konzentration an  $CD4^+CD45RO^+$  T-Zellen im Vergleich zu  $CD4^+CD45RA^+$  festgestellt werden, vermutlich durch eine Antigen-bedingte Umwandlung in  $CD4^+CD45RO^+$  T-Zellen (MCNEILL et al., 2004; HOU et al., 2014). Die IVIg-Therapie führte zu einer Erhöhung von  $CD4^+CD45RA^+$  und dem Verhältnis von TH/CTL, während gleichzeitig eine Abnahme der  $CD4^+CD45RO^+$  T-Zellen, der CTL und der  $CD19^+$  B-Zellen zu verzeichnen war (HOU et al., 2014). Aufgrund von diesen Untersuchungen besteht die Annahme, dass eine IVIg-Therapie eine reduzierte Antikörper-Produktion und verminderte toxische Effekte der CTL zur Folge hat, sowie eine neuroprotektive Wirkung über einen Shift von  $CD4^+CD45RO^+$  zu  $CD4^+CD45RA^+$  (HOU et al., 2014). Trotz der klinischen Wirksamkeit der IVIg-Therapie konnte im Gegensatz zur AIDP für die AMAN keine spezifische Lymphozytenpopulation vor und nach der Therapie mit IVIg nachgewiesen werden, was für eine zur AIDP unterschiedliche Pathogenese spricht (HOU et al., 2014). Eine WMI wäre auch als weitere Überprüfung einer IVIg-Therapie für kanine IMPN geeignet. Hierdurch könnte eine Kontrolle vor und nach der Therapie erfolgen, um die Auswirkungen auf das Vorkommen und Veränderungen in der Lymphozytenpopulation, in Assoziation mit der Auswirkung auf die Schädigungsbilder an den peripheren Nerven, zu überprüfen.

Eine Hinterfragung des TH-1/TH-2-Paradigmas als Erklärung für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wurde durch die Entdeckung der TH-17 eingeleitet (WU et al., 2016). Diese Entdeckung wird durch Studien an IFN- $\gamma$ -Knockout Mäusen bestätigt, bei denen zwar eine Abschwächung der TH-1-Immunantwort festgestellt werden konnte, die Mäuse aber gleichzeitig eine

deutlich schwerere klinische Ausprägung zeigten (ZHANG et al., 2012; WU et al., 2016). Diese Beobachtung könnte durch eine Beteiligung der TH-17 erklärt werden, da die IFN- $\gamma$ -Knockout Mäuse auch eine Erhöhung von IL-17A im Blut zeigten (ZHANG et al., 2012; WU et al., 2016). Zusätzlich belegen beim GBS erste Studien einen Zusammenhang zwischen einer Herabregulation der TH-17 und einer IVIg-Therapie (ZHANG et al., 2013; LI et al., 2014). Es scheint, als ob die TH-17 ebenso wie die TH-1 eine progressive Wirkung im Krankheitsprozess innehaben. Für eine Aufklärung der Beteiligung der TH-17 an der Ätiopathogenese des GBS werden aber noch weitere Studien benötigt. Zu prüfen ist auch, inwieweit diese Lymphozytensubpopulation an der Krankheitsentstehung der feline und kaninen IMPN beteiligt ist. Zudem können TH-17 und ihre Zytokine auch vielversprechende neue Therapieansatzmöglichkeiten bieten (WU et al., 2016).

Aus diesen Gründen sind in Abbildung 4 und Tabelle 5 mögliche zelluläre Marker für kanine und feline IMPN-Patienten für künftige Studien an WMI-Präparaten dargestellt. Diese Ansätze können entscheidende Beiträge zum Verstehen der Pathogenese als auch neue therapeutische Ansatzpunkte liefern.

**Tabelle 5. Marker für weitergehende zelluläre Untersuchungen an NFZ durch die WMI.**

Marker	Zelltyp
CD3 <sup>+</sup>	alle T-Zellen
CD4 <sup>+</sup>	TH
CD8 <sup>+</sup>	CTL
CD79a <sup>+</sup>	B-Zellen
CD56 <sup>+</sup>	Natürliche Killerzellen
FoxP3 <sup>+</sup>	T <sub>REGS</sub>
CD68 <sup>+</sup>	Makrophagen
CD3 <sup>+</sup> + CD 4 <sup>+</sup> + IL-17A <sup>+</sup>	TH-17

## 4.2 Detektion von AGA/AGKA durch die WMI

Der AIDP wird im Gegensatz zur AMAN meist eine durch TH-Zellen dominierte Krankheitsentwicklung zugesprochen (HOU et al., 2014). Nichtsdestotrotz gewann in den letzten Jahren die Untersuchung der humoralen Beteiligung, auch durch die Entdeckung der AGKA, immer mehr an Gewicht. Diese Bedeutung wird durch den Nachweis von Komplement- und Ig-Ablagerungen am äußeren Schwannzell-Plasmalemma von AIDP-Patienten unterstrichen (HAFER-MACKO et al., 1996b).

Antikörper können auf eine unterschiedliche Weise an der Entwicklung einer peripheren Neuropathie beteiligt sein. Zum einen können sie über eine Komplementaktivierung Phagozytosezellen anlocken, eine Störung in der Zell-Zell-Interaktion verursachen, zu einer Komplement-gestützten Zellzerstörung führen, oder eine Antikörper-abhängige zell-medierte Zytotoxizität und eine sekundäre Unterbrechung der normalen Zellfunktionen durch eine Endozytose des Antikörpers auslösen (HARTUNG et al., 1993; DALAKAS, 1996; HAFER-

MACKO et al., 1996a; CUDDON, 2002).

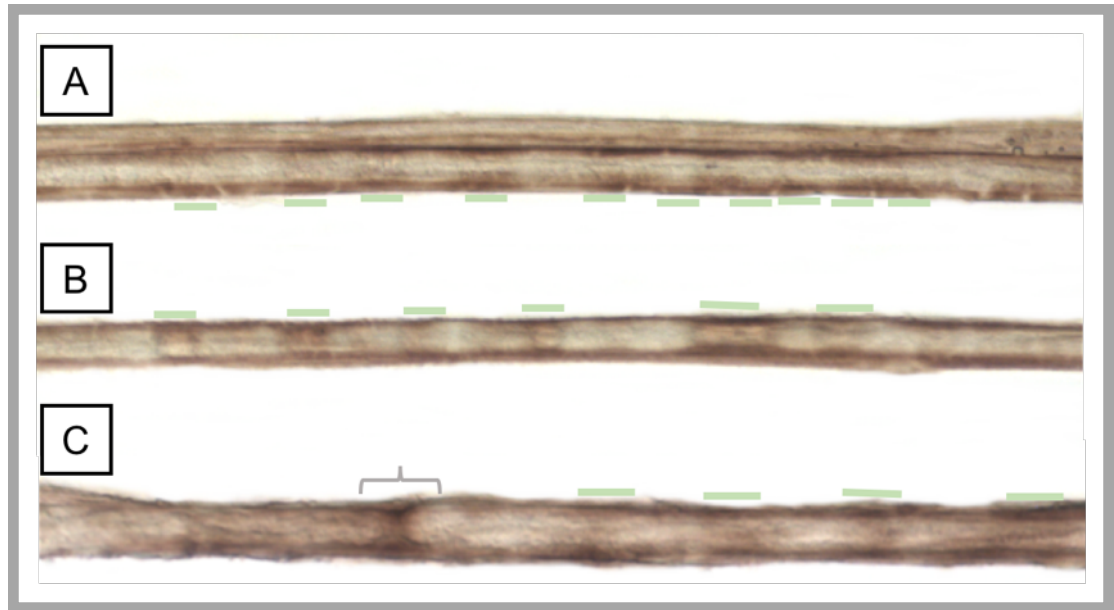
Die Lokalisation der Antikörper in peripheren Nerven kann durch die WMI erreicht werden. Mögliche humorale Marker für die Untersuchung von NFZ sind in Tabelle 6 dargestellt. Bei Hunden mit ACP konnten bereits abaxonale Anti-GM2-Ablagerungen an der Schwannzellmembran nachgewiesen werden (RUPP et al., 2013). Als Schädigungsmechanismus wird hier die Antikörper-vermittelte Komplementaktivierung vermutet, die eine Schädigung der Schwannzellen sowie segmentale Demyelinisierungen zur Folge hat (RUPP et al., 2013). Diese Entdeckung korreliert mit den oben beschriebenen abaxonalen Ablagerungen von C3d und C5b9 auf der Schwannzelloberfläche von AIDP-Patienten (HAFFER-MACKO et al., 1996b; PUTZU et al., 2000; RUPP et al., 2013). Darüber hinaus wurde bei Hunden mit ACP festgestellt, dass bei ca. der Hälfte der Anti-GM2- oder Anti-GA1-AGA-positiven Hunde eine GM2-Bindung unabhängig davon, welche weiteren Glykolipide mit demselben assoziiert waren, stattfand (RUPP et al., 2013). Die andere Hälfte der positiven Sera bevorzugte eine Bindung an GM2:Sulfatid oder GM2:Galaktocerebrosid Komplexe (RUPP et al., 2013). Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer gleichzeitigen Untersuchung von AGA und AGKA in kaninen und feline IMPN.

Im Gegensatz zu Schwannzell-assoziierten Komplementablagerungen bei der AIDP wurden bei AMAN-Patienten Komplement- und IgG-Ablagerungen im Bereich des Ranvierschen Schnürrings festgestellt (HAFFER-MACKO et al., 1996a). C3d-Ablagerungen auf dem Axolemma konnten vermehrt bei Nervenfasern mit paranodaler Retraktion detektiert werden (HAFFER-MACKO et al., 1996a). Zusätzlich wurden axolemmale C5b9- und IgG-Ablagerungen, sowie periaxonale Makrophagen nachgewiesen (HAFFER-MACKO et al., 1996a). Der pathologische Mechanismus, der hier vermutet wird, ist eine Antikörper-Bindung an den Nodien, gefolgt von einer Komplementaktivierung, Anlockung von Makrophagen und einer Wallerschen Degeneration (HAFFER-MACKO et al., 1996a).

Bei der in Teilstudie I durchgeführten IMPN-Subtypisierung fiel auf, dass der bei Hunden vorkommende Subtyp 2a ausgeprägte pathomorphologische Veränderungen, wie paranodale Retraktionen und dysmorphe Paranodien im Bereich der NPN-Region aufweist, die mit einem gleichzeitig sehr geringen

Entzündungszellvorkommen nicht zu erklären sind. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Subtyp 2a eine humoral geprägte Immunantwort aufweist. Zusätzlich ist die Frage, inwieweit humorale Mechanismen zu einer Entstehung von Subtyp 1 beitragen. Auch bei der AIDP gewann mit der Entdeckung der AGKA die Hinterfragung der zellulären Dominanz in der Krankheitsentstehung an Bedeutung.

Erste Untersuchungen zur WMI-gestützten Detektion von Anti-IgG wurden bereits durchgeführt (unpublizierte Daten). Diese Daten spiegeln aber nur vorläufige Ergebnisse wider, die weiter strukturiert und überarbeitet werden müssen. Die vorläufigen Untersuchungen zeigten einen verstärkten Nachweis von IgG für den gemischten Subtyp 3, gefolgt von Subtyp 2a. Eine Erklärung hierfür wäre, dass der Subtyp 3 ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium darstellt und die positiven Anti-IgG-Befunde könnten für eine Einleitung der attenuierenden humoralen Immunantwort stehen. Weiter unterlegt wird diese Vermutung durch die Verteilung der IgG-positiven Bereiche auf die SLK- und die NPN-Region (siehe Abbildung 5). Die ausschließlich nodalen IgG-Ablagerungen bei AMAN-Patienten in der progressiven Phase stehen hierzu im Gegensatz (HAFFER-MACKO et al., 1996a).



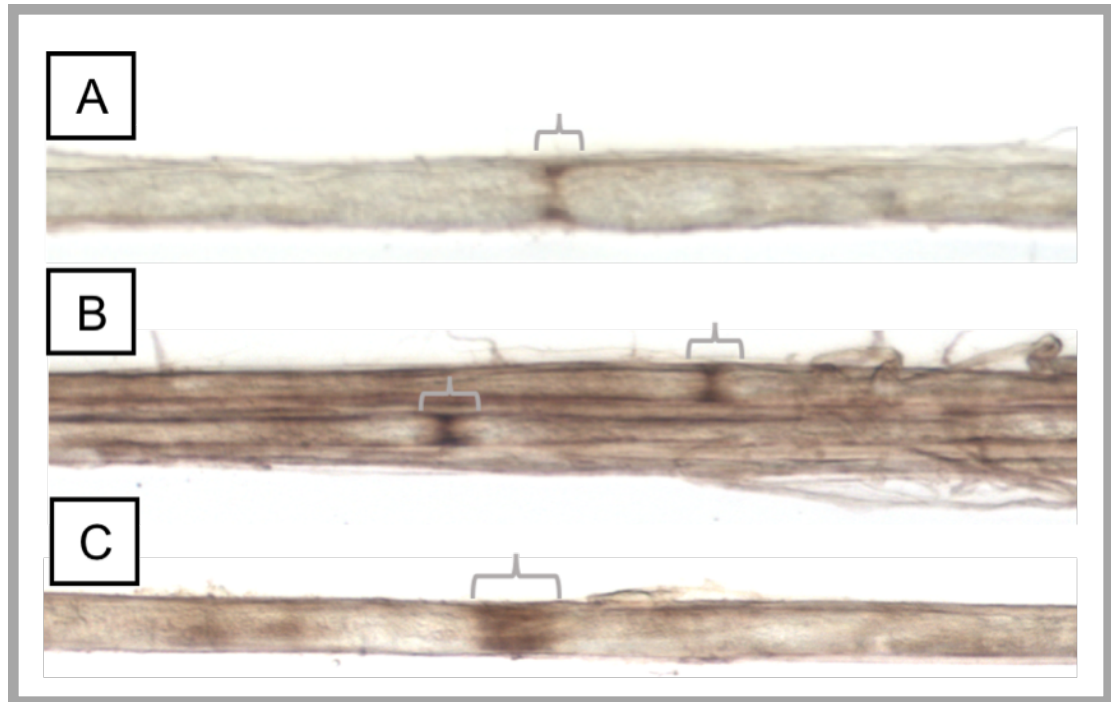
**Abbildung 5. Vorläufige Ergebnisse der Anti-IgG-WMI. (A) Anfärbung der SLK. (B) Betonte Anfärbung der SLK. (C) SLK-Muster mit zusätzlicher NPN-Komponente.**

**Graue Klammer: NPN-Färbung;**

**Grüne Linie: SLK-Färbung.**

Subtyp 2a zeigte hingegen eine exklusive Betonung der NPN-Region, was die Vermutung einer humoral gestützten Krankheitsentwicklung, wie auch bei der AMAN, bestärkt (siehe Abbildung 6).





**Abbildung 6. Vorläufige Ergebnisse mit Anti-IgG-WMI. (A) Positive Färbung mit Diaminobenzidin (DAB) am Ranvierschen Schürring. (B) Zwei Ranviersche Schnürringe mit positiver Färbung. (C) Ausweitung der nodalen immunhistochemischen Färbung auf die Paranodien.**

**Graue Klammer: NPN-Färbung.**

Hier gilt es nun weitere Nachforschungen zu betreiben, da durch die Identifikation der Angriffsstellen im peripheren Nerven die pathophysiologischen Auswirkungen sowie die daraus resultierenden klinischen Symptome erklärt werden und neue immunmodulatorische Therapien entwickelt werden können (siehe auch Tabelle 6 und Abbildung 7). Sinnvoll wäre hierfür ein Mapping der AGA/AGKA und Immunzellen an peripheren Nervenfasern durch die WMI. Für die Erfolgskontrolle der AGA/AGKA-WMI würde sich eine Markierung der detektierten Autoantikörper durch präformierte Antikörper, die an die konstante Fc-Region binden sollen, anbieten. Gleichzeitig sollten die Patientenserum auf das Vorhandensein von AGA/AGKA überprüft werden. Dies könnte durch eine Bestimmung der Bindungsstellen von im Patientenserum befindlichen Autoantikörpern an Kryoschnitten von peripheren Nervenfasern bewerkstelligt werden. Dadurch kann auch eine Eingrenzung der möglichen Zielantigene erfolgen.

**Tabelle 6. Humorale Marker für weitergehende WMI-Untersuchungen.**

Marker	Biologie
C1q	Teil des klassischen Komplementsystems, Subkomponente des ersten Komplementfaktors.
C5b9	C5b: Anlagerung an Zellmembran der Zielzelle, Bildung der ersten Komponente des Membranangriffskomplexes.
C3	C9: porenformende Untereinheit des Membranangriffskomplexes. Aktivierung des Komplementsystems, sowohl im klassischen als auch im alternativen Weg.
IgG	Monomer. Zuständig für die Aktivierung des Komplementsystems, die Opsonisierung und Neutralisation von Antigenen.
IgM	Pentamer. Zuständig für die Aktivierung des Komplementsystems und der Stimulation von Makrophagen.

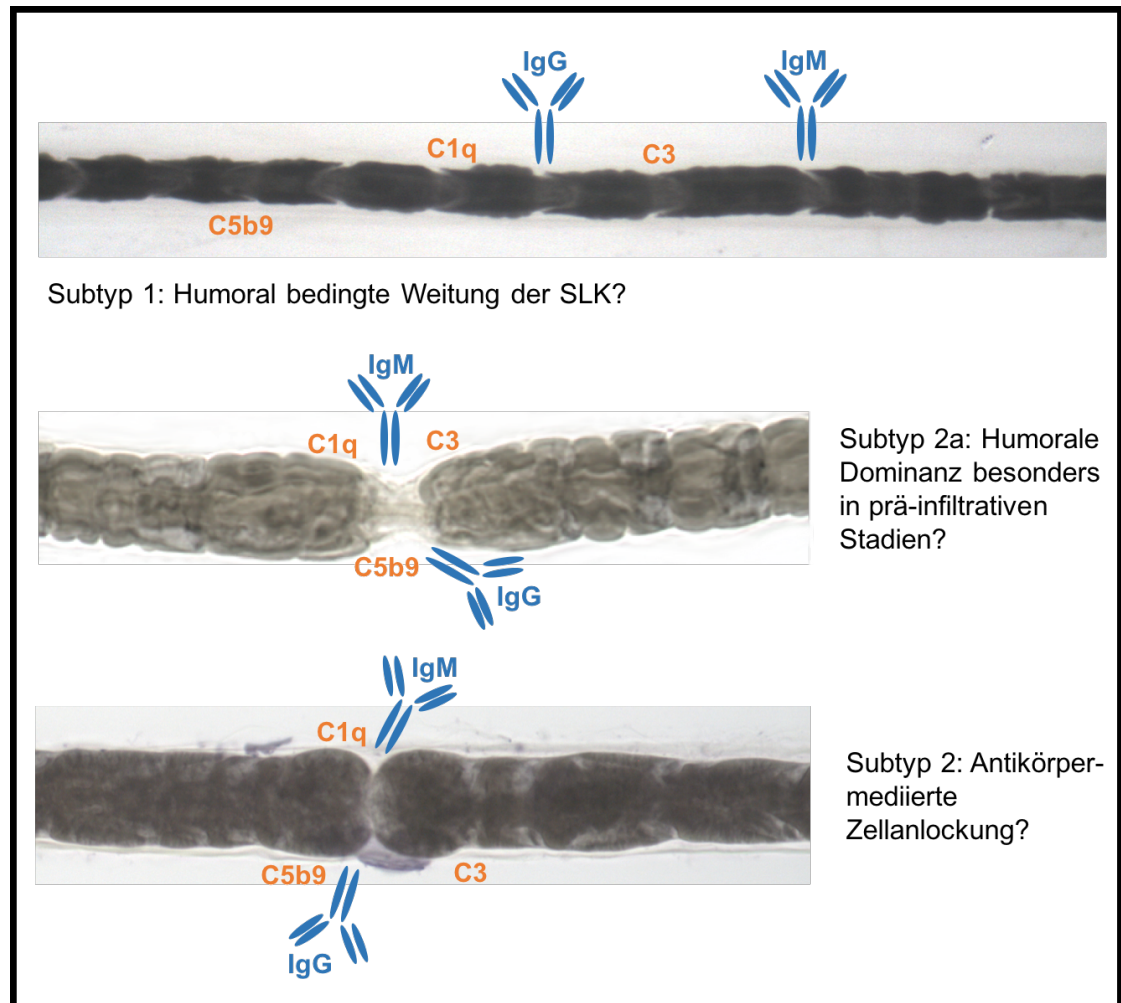


Abbildung 7. Möglichkeit der Detektion einer humoralen Beteiligung an prä- und früh-infiltrativen Stadien der IMPN-Subtypen durch die WMI.

Blau: Immunglobulin-spezifische Marker,

Orange: Marker für Komplementfaktoren.

#### 4.3 Kombination konventioneller fasermorphologischer Untersuchungen mit dem geweblichen Nachweis von Immunzellen und Autoantikörpern

Für eine genauere Darstellung der morphologischen Veränderungen der Nervenfasern mit gleichzeitiger Markierung der Immunzellen/Autoantikörper könnten Kombinationen aus strukturellen Färbungen, wie der Osmiumtetroxid-Färbung und immunhistochemischen Markern, getestet werden. Dadurch kann eine exaktere Abgrenzung von Basalmembran und Myelinscheide und eine genauere Zuordnung der Immunzellen/Autoantikörper zu den jeweiligen Strukturen der Nervenfasern erfolgen.

#### **4.4 Zytokinanalyse als Ergänzung und Bestätigung möglicher WMI-Ergebnisse**

Flankierend zu den oben erläuterten WMI-Untersuchungen auf zellulärer und humoraler Ebene wäre eine Probensammlung dieser Nerven für die Zytokinanalyse von Vorteil. Eine Spezifizierung der Immunreaktion durch eine quantitative Zytokinanalyse (RT-PCR) erlaubt eine Detektion eines möglichen Übergangs von TH-1- zu TH-2-medierte Reaktionen und dadurch Aussagen bezüglich aktiver und remittierender Abläufe (BADER et al., 2010).

Durch eine Kombination aller Untersuchungsergebnisse soll ein umfassendes Bild der zellulären und humoralen Vorgänge an den peripheren Nerven entstehen, das Aufschluss über Remission/Genesung und Wahl einer adäquaten Therapieform für den Patienten gibt.

## **5 Ausblicke**

Basierend auf der geplanten Diskriminierung der progressiven und remissiven Immunabläufe können die im Folgenden beschriebenen Projekte für zirkulierende Autoantikörper, eine Annäherung an immunogene Trigger, sowie Ansätze für neue immunmodulatorische Therapien weiterverfolgt werden.

### **5.1 Folgestudie für den Nachweis zirkulierender autoreaktiver Antikörper und Hinterleuchtung ihrer biologischen Bedeutung**

Zirkulierende Autoantikörper können durch den Einsatz von (1) unselektiven Mikrokryoarrays und durch (2) antigenspezifische ELISA- und Glykoarray-Techniken untersucht werden.

(1) In den Mikrokryoarrays können den Serumantikörpern aus Blutproben der IMPN-Patienten neurale Bindungsstellen mittels Gewebeschnitt (von kaninem/felinem ZNS, Nervenwurzel, Ganglien, periphere Nervenfasern, neuromuskulärer Endplatte und Blutgefäßen) angeboten werden. Eine Bestätigung der fixierten Antikörper kann durch das Auftragen von präformierten Anti-Fc-Antikörpern erfolgen. Eine Entschlüsselung der topographischen Variationen der Antigen- bzw. Gangliosid-Ausstattung kann über multisegmentale Nervenpanels realisiert werden.

(2) Die in vitro Tests auf AGA stützen sich auf Erkenntnisse der Studie zum Vorkommen von Anti-GM2-AGA bei Hunden (RUPP et al., 2013). Basierend auf diesen Untersuchungen kann Patientenserum im Dreifachansatz auf Gangliosid-beschichtete ELISA-Platten (Katze) und Polyvinylidfluorid-Folien (Hund, Katze) aufgebracht und über Chemolumineszenz und Autoradiographie auf Bindungen überprüft werden. Nach ersten Untersuchungen unterliegt beim Hund der ELISA mit einer Sensitivität von 32 % klar der Sensitivität des Glykoarray (60 %) (RUPP et al., 2013). Für Katzen liegen hierzu noch keine Untersuchungsergebnisse vor. Zudem ist die Gangliosid-Ausstattung der Nerven bei der Katze weitgehend unerforscht. Flankierend zu den serologischen Untersuchungen sollte daher die Glykolipidzusammensetzung mittels Tandem-Massenspektroskopie in Hinsicht auf die Zielantigene näher definiert werden.

Durch eine weitere Versuchreihe kann die immunbiologische Rolle der nachgewiesenen Anti-Nerv (Mikrokryoarray)-Antikörper bzw. AGA (ELISA/Glykolipidarray) über Komplement-Fixierungstests und Lymphozytenstimulationsassays in vitro und am frischen Nervenpräparat aus gesunden Kontrolltieren hinterleuchtet werden. Letzteres kann analog etablierter Pemphigus-Tests über eine Koinkubation des Patientenserums mit Komplement bzw. Lymphozyten gesunder Hunde und Katzen in die Wege geleitet werden (SITARU et al., 2002). Das Nervenpräparat sollte im Anschluss an die Exposition mikroskopisch und ultrastrukturell untersucht und mit den IMPN-Schädigungsbildern der im Vorfeld subtypisierten Biopsien verglichen werden. Im Falle einer ausbleibenden Schädigung, fehlender Ablagerung von Komplement und Lymphozytenstimulation, sowie einer unversehrten Nervenbiopsie, muss bei positivem Antikörper-Nachweis im Mikrokryoassay und ELISA/Glykoarray von einer neutralisierenden Wirkung des Antikörpers und damit einer rein neurophysiologischen Interferenz ausgegangen werden.

## **5.2 Folgestudie zur Annäherung an immunogene Trigger**

Untersuchungen auf (Oligo-) Klonalität der komplementaritätsbestimmenden Region 3 (CDR3) der jeweils involvierten T- und B-Zellrezeptoren könnten entscheidende Hinweise auf spezifische Krankheitsauslöser liefern (MORI et al., 2013; SIX et al., 2013). Bislang konnten beispielsweise bei B-Zell-getragenen Reaktionen über den Einsatz des CDR3-Spektratyping klonale Expansionen beim Menschen nachgewiesen werden (FOREMAN et al., 2008; SIX et al., 2013). Daraufhin ließen sich Sequenzhomologien zu bekannten viralen und bakteriellen Erregern überprüfen. Durch die Herstellung von rekombinanten Antikörpern (TILLER et al., 2008) und die Untersuchung ihrer Bindungstopographie im Nervengewebe könnte die pathogene Bedeutung des Antigens entschlüsselt werden.

## **5.3 Folgestudie zur Modulation der Immunantwort**

In Mäusestudien gelang es erstmals durch die gezielte Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis* eine Umprogrammierung von TH-1/TH-17-Reaktionen hin zu einer antiinflammatorischen TH-2-Antwort zu steuern (PANZER et al., 2012). Eine interdisziplinäre Arbeitsgruppe konnte diese

„therapeutische“ Infektion durch antigenbeschichtete Nanopartikel nachstellen und führt Studien an tierischen Immunerkrankungen des Respirationstrakts (KLIER et al., 2011; KLIER et al., 2012; KLIER et al., 2015) und der Haut (PRELAUD et al., 2013) durch. Die rezidivierende Atemwegsobstruktion (RAO) bei Pferden stellt eine allergische immun-medierte Erkrankung dar (KLIER et al., 2015) und die mit Cytosin-Phosphat-Guanin (CPG) beschichteten Gelatine-Nanopartikel (GN) wurden hier in einer Inhalationsstudie eingesetzt. (KLIER et al., 2011; KLIER et al., 2012; KLIER et al., 2015). Bei Hunden mit atopischer Dermatitis erfolgte eine Aufnahme der an GN gebundenen CPG durch mononukleäre Zellen (PRELAUD et al., 2013).

In beiden Fällen soll die T-Zell-Imbalance durch den Einsatz von CPG eine Beeinflussung der Signalwege in Immunzellen, mit nachfolgender Zytokinproduktion und Umschwenkung der TH-2- zu einer TH-1-Immunantwort, nach sich ziehen (RANKIN et al., 2001; VOLLMER et al., 2004; HASHIMOTO et al., 2005; PRELAUD et al., 2013). Der hinter der Verwendung von CPG stehende Mechanismus liegt vermutlich in einer über bestimmte Signalwege induzierten Aktivierung der T<sub>REGS</sub>, die im Folgenden eine Wiederherstellung des Gleichgewichts zwischen TH-1 und TH-2 bewirken (KLIER et al., 2015).

Die GN stellen eine elegante Lösung als Transportsystem dar, das gekennzeichnet ist durch seine immunologische Inaktivität, biologische Abbaubarkeit und eine gute Toleranz durch den Patienten (KLIER et al., 2015) und daher auch für Verwendung in kaninen/feline IMPN in Frage kommen würde. Allerdings wird hier vermutlich ein Shift von TH-1 zu TH-2 benötigt (ZHANG et al., 2013). Für eine TH-1- zu TH-2-Shift induzierende Beschichtung der GN könnte beispielsweise eine DNA-Isolierung aus dem Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis* erfolgen.

## **VI ZUSAMMENFASSUNG**

### **Strategien zur Subklassifizierung Guillain-Barré-artiger Polyneuropathien bei Hund und Katze**

Von Simone Ingrid Groß

In den letzten Jahren kam - betreffend der Klassifikation der GBS-Subtypen in demyelinisierend und axonal - die Frage auf, ob diese Einteilung sinnvoll ist, da sie die betroffenen Nervenfasereinheiten und damit die möglichen Zielantigene, die in eben jenen liegen, nicht berücksichtigt.

Neue Vorschläge richten den Fokus auf eine Benennung der Subtypen nach der primär betroffenen Nervenfasereinheit. Im Gegensatz zur Veterinärmedizin stellen Biopsieentnahmen bei Guillain-Barré-Syndrom (GBS)-Patienten eher die Ausnahme dar. Ziel dieser Studie war daher die histopathologische Untersuchung und Charakterisierung von an immunmediierter Polyneuropathie (IMPN) erkrankten Hunden und Katzen, mit einem Schwerpunkt auf der Evaluierung von Nervenfaserspuppräparationen (NFZ). NFZ ermöglichen die Untersuchung von mehreren aufeinander folgenden Internodien, mit einer Zuordnung von Läsionen und Infiltraten zu den jeweiligen Nervenfaserkompartimenten. Die Whole-Mount-Immunhistochemie (WMI) bietet für zukünftige Studien die Möglichkeit einer molekularbiologischen Untersuchung der Subtypen. Gleichzeitig wurde die Eignung der kaninen/felinen IMPN als spontane Tiermodelle näher untersucht, da die natürliche Entstehung der IMPN eine bessere Grundlage für die ätiopathogenetische Erforschung, besonders im Vergleich zum gängigen Modell der experimentellen autoimmunen Neuritis (EAN), bieten würde.

Hauptkriterium für die Aufnahme in Teilstudie I war eine Immunzell-Infiltration von prä-degenerativen Nervenfasern, sowie ein Ausschluss neurotroper Infektionskrankheiten. 19 Hunde und 15 Katzen erfüllten diese Kriterien. Vorbericht, klinische Präsentation und elektrodiagnostische Untersuchungsergebnisse wurden durch retrospektive Fragebögen erfasst. Es erfolgte ein Screening der Nervenbiopsien hinsichtlich der Verteilung der



Immunzellen, der betroffenen Nervenfasereinheiten und der nicht-inflammatorischen Läsionen. Die Immunantwort zeigte entweder eine Betonung der Schmidt-Lantermann-Einkerbung (SLK), eine nodal-paranodale (NPN)-Konzentration oder beides. Basierend auf diesen Infiltrations- und Läsions-Mustern, konnte eine Differenzierung von vier verschiedenen IMPN-Subtypen erfolgen. Subtyp 1 ist gekennzeichnet durch eine internodale Konzentration der Immunzellen mit Adhärenz/Invasion an/über die SLK. Im Gegensatz dazu ist Subtyp 2 charakterisiert durch eine Betonung der NPN-Region und wird unterteilt in einen früh-infiltrativen Subtyp 2a mit geringem Zellvorkommen und einen infiltrativen Subtyp 2b. Bei Subtyp 3 liegt eine Verteilung der Immunzellen entlang des kompletten Faserverlaufs, ohne Betonung einer bestimmten Region, vor. Eine generalisierte Verteilung kommt auch bei Subtyp 4 vor, mit einer Betonung der NPN-Region. Bei Hunden dominieren die reinen Subtypen (Subtyp 2 gefolgt von Subtyp 1), wohingegen bei Katzen vermehrt die gemischten Typen (Subtyp 4 gefolgt von Subtyp 3) anzutreffen sind. Inwieweit sich diese Subtypisierung auf die klinische Behandlung und Prognose auswirkt, muss in weiteren Studien überprüft werden.

Im nächsten Schritt erfolgte die Etablierung eines Grundprotokolls für die WMI von NFZ. Dieses Protokoll soll als Basis für eine weitere ätiopathogenetische Erforschung der kaninen und felines IMPN dienen. Die WMI ermöglicht eine dreidimensionale Darstellung der Nervenfasern mit gleichzeitigem Einblick in die molekulare Zusammensetzung der Nervenfasereinheiten. In Teilstudie II wurde hierfür ein Objektträger basierter Ansatz mit „versiegelter Kammer“ entwickelt, der die Durchdringung der Antikörper bis zu den axoplasmatischen Proteinen garantieren sollte. Probleme, die es dabei zu überwinden galt, waren eine durch die Mikrowellen-Behandlung bedingte Schrumpfung der Nervenfasern sowie die Gewährleistung einer ausreichenden Antikörper-Durchdringung bis ins Innere der Nervenfasern.

Um einen Erhalt der Nervenfasern während der Mikrowellenbehandlung zu erreichen, wurde eine Fixierung mit vier verschiedenen Klebstoffen getestet. Die ausgewählten Klebstoffe sollten wasserfest und hitzebeständig sein, sowie flach aushärten, um das Eindeckeln der Objektträger und eine entsprechende Fokussierung mit dem Mikroskop zu ermöglichen. Der Sekundenkleber zeigte die flachste Aushärtung, führte zu keiner Beeinflussung der

immunhistochemischen Färbung, erlaubte eine punktgenaue Auftragung ohne Zerfließen und ist mikrowellenbeständig. Im Hinblick auf die Mikrowellenbeständigkeit wurde der Sekundenkleber zwar von der Araldite-Verbindung übertroffen, die ebenfalls eine flache Aushärtung aufwies, teilweise aber mit der immunhistochemischen Färbung interferiert hat.

Um eine Durchdringung des verwendeten Antikörpers bis in das Innere der Nervenfaser zu garantieren, wurden zudem Versuche für die Permeabilisierung der Nervenbiopsien durchgeführt. Erfolgreich waren sowohl die prä-fixativen Behandlungen mit Flüssigstickstoff und Glycinpuffer, als auch die post-fixative Behandlungsmethode mit Proteinase K. Die besten Ergebnisse in Bezug auf Intensität, Konsistenz und Kontinuität der immunhistochemischen Färbung konnten hier durch Sekundenkleber-fixierte Nervenfasern und eine prä-fixative Behandlung mit Flüssigstickstoff oder Glycinpuffer erzielt werden. Aber auch Proteinase K ermöglichte eine ausreichende Permeabilisierung von bereits fixierten Nervenfasern.

Durch die Subtypisierung der IMPN erfolgt eine Unterteilung nach Schädigungsbildern in Assoziation mit einer Verteilung der Immunzellen und mit Betonung der involvierten Kompartimente. Durch die Etablierung des WMI Protokolls besteht die Möglichkeit, die identifizierten Subtypen molekularbiologisch zu untersuchen. Genauer gesagt ermöglicht die WMI eine Phänotypisierung der Immunzellen und eine Detektion von Anti-Gangliosid-Antikörpern und Anti-Gangliosid-Komplex-Antikörpern an Nervenfasern von betroffenen Hunden und Katzen. Die Hinterleuchtung dieser immunologischen Mechanismen und die Identifizierung der unterschiedlichen zellulären und humoralen Akteure ist von entscheidender Bedeutung für eine Aufklärung der Ätiopathogenese, auch im Hinblick auf eine Translation der Erkenntnisse für den Menschen bzw. der Bestätigung von vermuteten Parallelen und damit der weiteren Überprüfung als geeignetes Tiermodell.

## VII SUMMARY

### **Strategies for subclassification of Guillain-Barré-like polyneuropathies in dogs and cats**

By Simone Ingrid Groß

Recently the question arises, whether Guillain-Barré Syndrome (GBS) classification into axonal and demyelinating subtypes is useful, since it does not consider the affected subunits and thus the possible target antigens, which are located in the same. The aim of this study was the histopathological examination and classification of dogs and cats suffering from immune-mediated polyneuropathies (IMPEN), with focus on the evaluation of nerve fibre teasing preparations (NFT) and to assess whether axonal/demyelinating categorisation is suitable or should be questioned. In contrary to veterinary medicine, nerve biopsies are not part of the routine diagnostic work-up for GBS patients. Due to similarities of clinical course and presentation, as well as electrodiagnostic congruence, canine and feline IMPEN can be elucidating for aetiopathogenic GBS studies.

Especially NFT are helpful because of the continuous evaluation of internodes with assignment of inflammatory infiltrates and lesions to the respective nerve fibre subunit. Whole-mount immunohistochemistry (WMI) of NFT is a promising method to study the molecular composition of IMPEN in future studies. At the same time an evaluation of feline/canine immune-mediated polyradiculoneuropathy (IMPEN), with regard to suitability as a spontaneous animal model took place, as IMPEN provide advantages in respect of aetiopathogenic research, especially compared to experimental autoimmune neuritis (EAN).

Screening of nerve biopsies with regard to immune cell distribution, affected nerve fibre subunit and non-inflammatory lesions ensued. The immune response showed either emphasis of Schmidt-Lanterman clefts (SLC), concentration in the nodal-paranodal (NPN) region or both. Based on these infiltration and lesion patterns, a differentiation into four distinct IMPEN subtypes

was carried out.

Next step was to develop a basic WMI protocol for NFT. This protocol will provide an aetiopathogenic research base to investigate canine and feline IMPN in further studies. WMI offers three-dimensional insights along the course of the nerve fibres together with their molecular composition. A slide based “sealed chamber” approach was developed, to guarantee permeabilisation till the innermost part of the nerve fibre. In contrast to histological slides, microwave treatment of individual nerve fibres resulted in coil up and shrinkage due to protein denaturation. To preserve nerve fibres during microwave treatment, they were permanently straightend. Testing a couple of industrial glues, two commercial glues fulfilled the requirements for excellent tip-fixation of even lubricated nerve fibres with some differences in microwave stability and staining quality. Instant adhesive showed slightly poorer microwave resistance but on the other hand did not interfere with immunohistochemical staining as the araldite compound.

Effective penetration of antibodies was achieved with prefixative permeabilisation with liquid nitrogen or glycine buffer and postfixative permeabilisation with Proteinase K. Overall, best results in regard of intense, consistent and continuous staining were attained by instant adhesive tip-fixation and permeabilisation with liquid nitrogen or glycine buffer. Proteinase K allowed for sufficient permeabilisation of already fixed nerve fibres.

IMPN subtyping allows for co-registration of inflammatory infiltrates and lesion patterns with regard to the involved nerve fibre subunit. WMI permits molecular investigation of the different subtypes, enabling detection of autoantibodies and phenotyping of immune cells. Clarifying these immunological mechanisms and the identification of the different cellular and humoral actors is of crucial importance for further elucidation of the aetiopathogenesis, especially with respect to translation for the GBS and further evaluation as suitable animal model.

## VIII LITERATURVERZEICHNIS

- Abromson-Leeman S, Bronson R, Dorf ME. Experimental autoimmune peripheral neuritis induced in BALB/c mice by myelin basic protein-specific T cell clones. *J Exp Med* 1995; 182: 587-92.
- Allenbach Y, Benveniste O, Goebel HH, Stenzel W. Review: Integrated classification of inflammatory myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2017;
- Ang CW, Jacobs BC, Laman JD. The Guillain-Barre syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends Immunol* 2004; 25: 61-6.
- Anor S. Acute lower motor neuron tetraparesis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2014; 44: 1201-22.
- Asbury AK, Arnason BG, Adams RD. The inflammatory lesion in idiopathic polyneuritis. Its role in pathogenesis. *Medicine (Baltimore)* 1969; 48: 173-215.
- Asbury AK, Cornblath DR. Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 1990; 27 Suppl: S21-4.
- Bader SR, Kothlow S, Trapp S, Schwarz SC, Philipp HC, Weigend S, Sharifi AR, Preisinger R, Schmahl W, Kaspers B, Matiassek K. Acute paretic syndrome in juvenile White Leghorn chickens resembles late stages of acute inflammatory demyelinating polyneuropathies in humans. *J Neuroinflammation* 2010; 7: 7.
- Benamer HT, Bredan A. Guillain-Barre syndrome in Arab countries: a systematic review. *J Neurol Sci* 2014; 343: 221-3.
- Bensfield AC, Evans J, Pesayco JP, Mizisin AP, Shelton GD. Recurrent demyelination and remyelination in 37 young Bengal cats with polyneuropathy. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 882-9.
- Blum S, McCombe PA. Genetics of Guillain-Barre syndrome (GBS) and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP): current knowledge and future directions. *J Peripher Nerv Syst* 2014; 19: 88-103.
- Braund KG, Vallat JM, Steiss JE, Panangala VS, Zimmer PL. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in dogs and cats. *J Peripher Nerv Syst* 1996; 1: 149-55.
- Brettschneider J, Petzold A, Sussmuth S, Tumani H. Cerebrospinal fluid biomarkers in Guillain-Barre syndrome--where do we stand? *J Neurol* 2009; 256: 3-12.
- Caudie C, Vial C, Bancel J, Petiot P, Antoine JC, Gonnaud PM. [Antiganglioside autoantibody profiles in Guillain-Barre syndrome]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2002; 60: 589-97.
- Chetboul V. Cas clinique: polyradiculonévrite post-vaccinale. *Le Point vétérinaire* 1989; 21: 83-5.
- Chiba A, Kusunoki S, Obata H, Machinami R, Kanazawa I. Serum anti-GQ1b IgG antibody is associated with ophthalmoplegia in Miller Fisher

- syndrome and Guillain-Barre syndrome: Clinical and immunohistochemical studies. *Neurology* 1993; 43: 1911-.
- Chrisman CL. Polyneuropathies of cats. *J Small Anim Pract* 2000; 41: 384-9.
- Coleman ES. Clostridial neurotoxins: Tetanus and botulism. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1998; 20: 1089-96.
- Cook SD, Dowling PC. The role of autoantibody and immune complexes in the pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1981: 70-90.
- Cosi V, Versino M. Guillain-Barre syndrome. *Neurol Sci* 2006; 27 Suppl 1: S47-51.
- Cuddon PA (1994) Acute canine idiopathic polyradiculoneuropathy-electrophysiology, CSF analysis and immunology. *Proceedings Eighth Annual Symposium of the European Society of Veterinary neurology*. Limoges, France. 34-6
- Cuddon PA. Electrophysiologic assessment of acute polyradiculoneuropathy in dogs: comparison with Guillain-Barre syndrome in people. *J Vet Intern Med* 1998; 12: 294-303.
- Cuddon PA. Coonhound paralysis (idiopathic polyradiculoneuritis). In: *The 5-Minute Veterinary Consult*, 2 edn. Tilley LP, Smith FWK, eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001: 588-9.
- Cuddon PA. Acquired canine peripheral neuropathies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2002; 32: 207-49.
- Cummings JF, Haas DC. Coonhound paralysis. An acute idiopathic polyradiculoneuritis in dogs resembling the Landry-Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Sci* 1966; 4: 51-81.
- Cummings JF, Haas DC. Animal model for human disease: Idiopathic polyneuritis, Guillain-Barré Syndrome. Animal model: Coonhound paralysis, idiopathic polyradiculoneuritis of coonhounds. *Am J Pathol*. 1972; 66: 189-92.
- Cummings JF, de Lahunta A. Chronic relapsing polyradiculoneuritis in a dog. A clinical, light- and electron-microscopic study. *Acta Neuropathol* 1974a; 28: 191-204.
- Cummings JF, de Lahunta A. Hypertrophic neuropathy in a dog. *Acta Neuropathol* 1974b; 29: 325-36.
- Cummings JF, de Lahunta A, Holmes DF, Schultz RD. Coonhound paralysis. Further clinical studies and electron microscopic observations. *Acta Neuropathol* 1982; 56: 167-78.
- Dalakas MC. Autoimmune peripheral neuropathies. In: *Clinical immunology*, 1 edn. Rich RR, ed. St. Louis: Mosby-Year Book 1996: 1377-2095.
- Deng H, Yang X, Jin T, Wu J, Hu LS, Chang M, Sun XJ, Adem A, Winblad B, Zhu J. The role of IL-12 and TNF-alpha in AIDP and AMAN. *Eur J Neurol* 2008; 15: 1100-5.
- Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC, Ranchin B, Fabien

- N, Cochat P, Pouteil-Noble C, Trolliet P, Durieu I, Tebib J, Kassai B, Ansieau S, Puisieux A, Eliaou JF, Bonnefoy-Berard N. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol* 2009; 10: 778-85.
- Douglas MR, Winer JB. Guillain-Barre syndrome and its treatment. *Expert Rev Neurother* 2006; 6: 1569-74.
- Eldar AH, Chapman J. Guillain Barre syndrome and other immune mediated neuropathies: diagnosis and classification. *Autoimmun Rev* 2014; 13: 525-30.
- Feasby TE, Gilbert JJ, Brown WF, Bolton CF, Hahn AF, Koopman WF, Zochodne DW. An acute axonal form of Guillain-Barre polyneuropathy. *Brain* 1986; 109 ( Pt 6): 1115-26.
- Fisher M. An unusual variant of acute idiopathic polyneuritis (syndrome of ophthalmoplegia, ataxia and areflexia). *N Engl J Med* 1956; 255: 57-65.
- Fokke C, van den Berg B, Drenthen J, Walgaard C, van Doorn PA, Jacobs BC. Diagnosis of Guillain-Barre syndrome and validation of Brighton criteria. *Brain* 2014; 137: 33-43.
- Foreman AL, Lemerrier B, Lim A, Kourlisky P, Kenny T, Gershwin ME, Gougeon ML. VH gene usage and CDR3 analysis of B cell receptor in the peripheral blood of patients with PBC. *Autoimmunity* 2008; 41: 80-6.
- Freeman PM, Harcourt-Brown TR, Jeffery ND, Granger N. Electrophysiologic evidence of polyneuropathy in a cat with signs of bilateral brachial plexus neuropathy. *J Am Vet Med Assoc* 2009; 234: 240-4.
- Funamoto M, Nibe K, Morozumi M, Edamura K, Uchida K. Pathological features of ganglioradiculitis (sensory neuropathy) in two dogs. *J Vet Med Sci* 2007; 69: 1247-53.
- Gabriel CM, Hughes RA, Moore SE, Smith KJ, Walsh FS. Induction of experimental autoimmune neuritis with peripheral myelin protein-22. *Brain* 1998; 121 ( Pt 10): 1895-902.
- Gehring R, Eggars B. Suspected post-vaccinal acute polyradiculoneuritis in a puppy. *J S Afr Vet Assoc* 2001; 72: 96.
- Gerritsen RJ, van Nes JJ, van Niel MH, van den Ingh TS, Wijnberg ID. Acute idiopathic polyneuropathy in nine cats. *Vet Q* 1996; 18: 63-5.
- Gesellschaft für Neuropädiatrie, Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, Neurologie DGfr. S1-Leitlinie: Guillain-Barré Syndrom im Kindes- und Jugendalter. <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/022-008.html>: AWMF online Das Portal der wissenschaftlichen Medizin 2012: 022/007.
- Gigi E, Raptopoulou-Gigi M, Kalogeridis A, Masiou S, Orphanou E, Vrettou E, Lalla TH, Sinakos E, Tsapas V. Cytokine mRNA expression in hepatitis C virus infection: TH1 predominance in patients with chronic hepatitis C and TH1-TH2 cytokine profile in subjects with self-limited disease. *J Viral*

- Hepat 2008; 15: 145-54.
- Gold R, Hartung HP, Toyka KV. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today* 2000; 6: 88-91.
- Goodyear CS, O'Hanlon GM, Plomp JJ, Wagner ER, Morrison I, Veitch J, Cochrane L, Bullens RW, Molenaar PC, Conner J, Willison HJ. Monoclonal antibodies raised against Guillain-Barre syndrome-associated *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides react with neuronal gangliosides and paralyze muscle-nerve preparations. *J Clin Invest* 1999; 104: 697-708.
- Govoni V, Granieri E. Epidemiology of the Guillain-Barre syndrome. *Curr Opin Neurol* 2001; 14: 605-13.
- Granger N, Stalin CE, Brown TB, Jeffery ND. Idiopathic polyradiculoneuropathy in a Bengal cat: electrophysiological findings and 1 year follow-up. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 603-7.
- Griffin JW, Li CY, Ho TW, Xue P, Macko C, Gao CY, Yang C, Tian M, Mishu B, Cornblath DR. Guillain-Barré syndrome in northern China. The spectrum of neuropathological changes in clinically defined cases. *Brain* 1995; 118
- Griffin JW, Li CY, Ho TW, Tian M, Gao CY, Xue P, Mishu B, Cornblath DR, Macko C, McKhann GM, Asbury AK. Pathology of the motor-sensory axonal Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 1996a; 39: 17-28.
- Griffin JW, Li CY, Macko C, Ho TW, Hsieh ST, Xue P, Wang FA, Cornblath DR, McKhann GM, Asbury AK. Early nodal changes in the acute motor axonal neuropathy pattern of the Guillain-Barre syndrome. *J Neurocytol* 1996b; 25: 33-51.
- Gross S, Kolb N, Rosati M, Matiassek K. Fix the problem - A practical guide to whole-mount immunohistochemistry of teased nerve fibres. *J Neurosci Methods* 2017; 298: 8-22.
- Guillain G, Barré JA, Strohl A. Radiculoneuritis syndrome with hyperalbuminosis of cerebrospinal fluid without cellular reaction. Notes on clinical features and graphs of tendon reflexes. 1916 [Article in French]. *Ann Médecine Interne* 1999; 150: 24-32.
- Gutierrez-Quintana R, Cuesta-Garcia N, Wessmann A, Johnston P, Penderis J. Acute motor and sensory polyganglioradiculoneuritis in a cat: clinical and histopathological findings. *J Feline Med Surg* 2015; 17: 191-4.
- Hadden RD, Cornblath DR, Hughes RA, Zielasek J, Hartung HP, Toyka KV, Swan AV. Electrophysiological classification of Guillain-Barre syndrome: clinical associations and outcome. Plasma Exchange/Sandoglobulin Guillain-Barre Syndrome Trial Group. *Ann Neurol* 1998; 44: 780-8.
- Hadden RDM, Karch H, Hartung HP, Zielasek J, Weissbrich B, Schubert J, Weishaupt A, Cornblath DR, Swan AV, Hughes RAC, Toyka KV. Preceding infections, immune factors, and outcome in Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 2001; 56: 758-65.
- Hafer-Macko C, Hsieh ST, Li CY, Ho TW, Sheikh K, Cornblath DR, McKhann GM, Asbury AK, Griffin JW. Acute motor axonal neuropathy: an antibody-



- mediated attack on axolemma. *Ann Neurol* 1996a; 40: 635-44.
- Hafer-Macko CE, Sheikh KA, Li CY, Ho TW, Cornblath DR, McKhann GM, Asbury AK, Griffin JW. Immune attack on the Schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 1996b; 39: 625-35.
- Halstead SK, O'Hanlon GM, Humphreys PD, Morrison DB, Morgan BP, Todd AJ, Plomp JJ, Willison HJ. Anti-disialoside antibodies kill perisynaptic Schwann cells and damage motor nerve terminals via membrane attack complex in a murine model of neuropathy. *Brain* 2004; 127: 2109-23.
- Harness J, McCombe PA. Increased levels of activated T-cells and reduced levels of CD4/CD25+ cells in peripheral blood of Guillain-Barre syndrome patients compared to controls. *J Clin Neurosci* 2008; 15: 1031-5.
- Hartung HP, Schwenke C, Bitter-Suermann D, Toyka KV. Guillain-Barre syndrome: activated complement components C3a and C5a in CSF. *Neurology* 1987; 37: 1006-9.
- Hartung HP, Stoll G, Toyka KV. Immune reactions in the peripheral nervous system. In: *Peripheral Neuropathy*, 3 edn. Dyck PJ, Thomas PK, eds. Philadelphia: WB Saunders 1993: 418-44.
- Hashimoto M, Asahina Y, Sano J, Kano R, Moritomo T, Hasegawa A. Cloning of canine toll-like receptor 9 and its expression in dog tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 106: 159-63.
- Hays AP, Lee SS, Latov N. Immune reactive C3d on the surface of myelin sheaths in neuropathy. *J Neuroimmunol* 1988; 18: 231-44.
- Hemachudha T, Griffin DE, Chen WW, Johnson RT. Immunologic studies of rabies vaccination-induced Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 1988; 38: 375-8.
- Hiraga A, Kuwabara S, Ogawara K, Misawa S, Kanesaka T, Koga M, Yuki N, Hattori T, Mori M. Patterns and serial changes in electrodiagnostic abnormalities of axonal Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 2005; 64: 856-60.
- Hirschvogel K (2012) Untersuchungen zum Krankheitsverlauf der Akuten Caninen Polyradikuloneuritis unter Intravenöser Immunglobulintherapie. In: *Tierärztliche Fakultät. Ludwig-Maximilians-Universität München*
- Hirschvogel K, Jurina K, Steinberg TA, Matiassek LA, Matiassek K, Beltran E, Fischer A. Clinical course of acute canine polyradiculoneuritis following treatment with human IV immunoglobulin. *J Am Anim Hosp Assoc* 2012; 48: 299-309.
- Ho TW, Mishu B, Li CY, Gao CY, Cornblath DR, Griffin JW, Asbury AK, Blaser MJ, McKhann GM. Guillain-Barre syndrome in northern China. Relationship to *Campylobacter jejuni* infection and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 1995; 118 ( Pt 3): 597-605.
- Ho TW, Willison HJ, Nachamkin I, Li CY, Veitch J, Ung H, Wang GR, Liu RC, Cornblath DR, Asbury AK, Griffin JW, McKhann GM. Anti-GD1a antibody is associated with axonal but not demyelinating forms of Guillain-Barré

- syndrome. *Ann Neurol* 1999; 45: 168-73.
- Holt N, Murray M, Cuddon PA, Lappin MR. Seroprevalence of various infectious agents in dogs with suspected acute canine polyradiculoneuritis. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 261-6.
- Hou HQ, Miao J, Feng XD, Han M, Song XJ, Guo L. Changes in lymphocyte subsets in patients with Guillain-Barre syndrome treated with immunoglobulin. *BMC Neurol* 2014; 14: 202.
- Hughes RA, Rees JH. Clinical and epidemiologic features of Guillain-Barre syndrome. *J Infect Dis* 1997; 176 Suppl 2: S92-8.
- Hughes RA, Hadden RD, Gregson NA, Smith KJ. Pathogenesis of Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol* 1999; 100: 74-97.
- Hughes RA, Allen D, Makowska A, Gregson NA. Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2006; 11: 30-46.
- Hughes RA, van Doorn PA. Corticosteroids for Guillain-Barre syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2012: CD001446.
- Hughes RAC, Cornblath DR. Guillain-Barré syndrome. *The Lancet* 2005; 366: 1653-66.
- Illa I, Ortiz N, Gallard E, Juarez C, Grau JM, Dalakas MC. Acute axonal Guillain-Barre syndrome with IgG antibodies against motor axons following parenteral gangliosides. *Ann Neurol* 1995; 38: 218-24.
- Islam Z, Jacobs BC, van Belkum A, Mohammad QD, Islam MB, Herbrink P, Diorditsa S, Luby SP, Talukder KA, Endtz HP. Axonal variant of Guillain-Barre syndrome associated with *Campylobacter* infection in Bangladesh. *Neurology* 2010; 74: 581-7.
- Jacobs BC, van Doorn PA, Schmitz PI, Tio-Gillen AP, Herbrink P, Visser LH, Hooijkass H, van der Meche FG. *Campylobacter jejuni* infections and anti-GM1 antibodies in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 1996; 40: 181-7.
- Jacobs BC, Koga M, van Rijs W, Geleijns K, van Doorn PA, Willison HJ, Yuki N. Subclass IgG to motor gangliosides related to infection and clinical course in Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol* 2008; 194: 181-90.
- Jeandel A, Matiassek K, Blot S. Acute idiopathic polyneuritis with spontaneous remission in an Abyssinian cat. *Can Vet J* 2015; 56: 1279-82.
- Johannis W, Renno JH, Klatt AR, Wielckens K. Anti-glycolipid antibodies in patients with neuropathy: a diagnostic assessment. *J Clin Neurosci* 2014; 21: 488-92.
- Joint Task Force of the EFNS and the PNS. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *J Peripher Nerv Syst* 2005; 10: 220-8.

- Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Ganglioside complexes as new target antigens in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 2004; 56: 567-71.
- Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies associated with severe disability in GBS. *J Neuroimmunol* 2007; 182: 212-8.
- Kannan MA, Ch RK, Jabeen SA, Mridula KR, Rao P, Borgohain R. Clinical, electrophysiological subtypes and antiganglioside antibodies in childhood Guillain-Barre syndrome. *Neurol India* 2011; 59: 727-32.
- Kaplan JE, Katona P, Hurwitz ES, Schonberger LB. Guillain-Barre syndrome in the United States, 1979-1980 and 1980-1981. Lack of an association with influenza vaccination. *JAMA* 1982; 248: 698-700.
- Kaplan JE, Schonberger LB, Hurwitz ES, Katona P. Guillain-Barre syndrome in the United States, 1978-1981: additional observations from the national surveillance system. *Neurology* 1983; 33: 633-7.
- Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, Hartung HP. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 2001; 64: 109-27.
- Klier J, May A, Fuchs S, Schillinger U, Plank C, Winter G, Gehlen H, Coester C. Immunostimulation of bronchoalveolar lavage cells from recurrent airway obstruction-affected horses by different CpG-classes bound to gelatin nanoparticles. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 144: 79-87.
- Klier J, Fuchs S, May A, Schillinger U, Plank C, Winter G, Coester C, Gehlen H. A nebulized gelatin nanoparticle-based CpG formulation is effective in immunotherapy of allergic horses. *Pharm Res* 2012; 29: 1650-7.
- Klier J, Lehmann B, Fuchs S, Reese S, Hirschmann A, Coester C, Winter G, Gehlen H. Nanoparticulate CpG immunotherapy in RAO-affected horses: phase I and IIa study. *J Vet Intern Med* 2015; 29: 286-93.
- Korinthenberg R. Acute polyradiculoneuritis: Guillain-Barre syndrome. *Handb Clin Neurol* 2013; 112: 1157-62.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 485-517.
- Koski CL, Sanders ME, Swoveland PT, Lawley TJ, Shin ML, Frank MM, Joiner KA. Activation of terminal components of complement in patients with Guillain-Barre syndrome and other demyelinating neuropathies. *J Clin Invest* 1987; 80: 1492-7.
- Kusunoki S, Kaida K, Ueda M. Antibodies against gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barre syndrome: new aspects of research. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780: 441-4.
- Kuwabara S, Yuki N, Koga M, Hattori T, Matsuura D, Miyake M, Noda M. IgG anti-GM1 antibody is associated with reversible conduction failure and axonal degeneration in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1998; 44: 202-8.

- Kuwabara S. Guillain-Barre syndrome: epidemiology, pathophysiology and management. *Drugs* 2004; 64: 597-610.
- Landi G, D'Alessandro R, Dossi BC, Ricci S, Simone IL, Ciccone A. Guillain-Barre syndrome after exogenous gangliosides in Italy. *BMJ* 1993; 307: 1463-4.
- Lane JR, de Lahunta A. Polyneuritis in a cat. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1984; 20: 1006-8.
- Langmuir AD, Bregman DJ, Kurland LT, Nathanson N, Victor M. An epidemiologic and clinical evaluation of Guillain-Barre syndrome reported in association with the administration of swine influenza vaccines. *Am J Epidemiol* 1984; 119: 841-79.
- Lehrich JR, Arnason BG. Suppression of experimental allergic neuritis in rats by prior immunization with nerve in saline. *Acta Neuropathol* 1971; 18: 144-9.
- Leipe J, Grunke M, Dechant C, Reindl C, Kerzendorf U, Schulze-Koops H, Skapenko A. Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 2876-85.
- Li CY, Xue P, Tian WQ, Liu RC, Yang C. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in the chicken: an animal model of axonal Guillain-Barre syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 1996; 61: 279-84.
- Li S, Yu M, Li H, Zhang H, Jiang Y. IL-17 and IL-22 in cerebrospinal fluid and plasma are elevated in Guillain-Barre syndrome. *Mediators Inflamm* 2012; 2012: 260473.
- Li S, Jin T, Zhang HL, Yu H, Meng F, Concha Quezada H, Zhu J. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are elevated in the Guillain-Barre syndrome and downregulated by IVIg treatments. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 740947.
- Li XL, Dou YC, Liu Y, Shi CW, Cao LL, Zhang XQ, Zhu J, Duan RS. Atorvastatin ameliorates experimental autoimmune neuritis by decreased Th1/Th17 cytokines and up-regulated T regulatory cells. *Cell Immunol* 2011; 271: 455-61.
- Luijten JA, Baart de la F-K. The occurrence of IgM and complement factors along myelin sheaths of peripheral nerves. An immunohistochemical study of the Guillain-Barre syndrome. Preliminary communication. *J Neurol Sci* 1972; 15: 219-24.
- Lunn MPT, Willison HJ. Diagnosis and treatment in inflammatory neuropathies. *Postgraduate Medical Journal* 2009; 85: 437-46.
- Maddur MS, Rabin M, Hegde P, Bolgert F, Guy M, Vallat JM, Magy L, Bayry J, Kaveri SV. Intravenous immunoglobulin exerts reciprocal regulation of Th1/Th17 cells and regulatory T cells in Guillain-Barre syndrome patients. *Immunol Res* 2014; 60: 320-9.
- Makowska A, Pritchard J, Sanvito L, Gregson N, Peakman M, Hayday A, Hughes R. Immune responses to myelin proteins in Guillain-Barre

- syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 664-71.
- Malik R, France MP, Churcher R, Mc Donald B. Prednisolone responsive neuropathy in a cat. *Journal of Small Animal Practice* 1991; 32: 529-32.
- Matiassek LA, Lujan Feliu-Pascual A, Shelton DG, De Risio L, Matiassek K. Axonal neuropathy with unusual clinical course in young Snowshoe cats. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 1005-10.
- McGonigal R, Rowan EG, Greenshields KN, Halstead SK, Humphreys PD, Rother RP, Furukawa K, Willison HJ. Anti-GD1a antibodies activate complement and calpain to injure distal motor nodes of Ranvier in mice. *Brain* 2010; 133: 1944-60.
- McKhann GM, Cornblath DR, Ho T, Li CY, Bai AY, Wu HS, Yei QF, Zhang WC, Zhaori Z, Jiang Z, et al. Clinical and electrophysiological aspects of acute paralytic disease of children and young adults in northern China. *Lancet* 1991; 338: 593-7.
- McKhann GM, Cornblath DR, Griffin JW, Ho TW, Li CY, Jiang Z, Wu HS, Zhaori G, Liu Y, Jou LP, et al. Acute motor axonal neuropathy: a frequent cause of acute flaccid paralysis in China. *Ann Neurol* 1993; 33: 333-42.
- McNeill L, Cassady RL, Sarkardei S, Cooper JC, Morgan G, Alexander DR. CD45 isoforms in T cell signalling and development. *Immunol Lett* 2004; 92: 125-34.
- Meulstee J, van der Meche FG. Electrodiagnostic criteria for polyneuropathy and demyelination: application in 135 patients with Guillain-Barre syndrome. Dutch Guillain-Barre Study Group. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; 59: 482-6.
- Mizuno K, Nagamatsu M, Hattori N, Yamamoto M, Goto H, Kuniyoshi K, Sobue G. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy with diffuse and massive peripheral nerve hypertrophy: distinctive clinical and magnetic resonance imaging features. *Muscle Nerve* 1998; 21: 805-8.
- Molin J, Marquez M, Raurell X, Matiassek K, Ferrer I, Pumarola M. Acute clinical onset chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in a dog. *Muscle Nerve* 2011; 44: 441-4.
- Mori A, Deola S, Xumerle L, Mijatovic V, Malerba G, Monsurro V. Next generation sequencing: new tools in immunology and hematology. *Blood Res* 2013; 48: 242-9.
- Nachamkin I, Arzarte Barbosa P, Ung H, Lobato C, Gonzalez Rivera A, Rodriguez P, Garcia Briseno A, Cordero LM, Garcia Perea L, Perez JC, Ribera M, Aldama PC, Guitierrez GD, Sarnat LF, Garcia MR, Veitch J, Fitzgerald C, Cornblath DR, Rodriguez Pinto M, Griffin JW, Willison HJ, Asbury AK, McKhann GM. Patterns of Guillain-Barre syndrome in children: results from a Mexican population. *Neurology* 2007; 69: 1665-71.
- Nagasawa K, Kuwabara S, Misawa S, Fujii K, Tanabe Y, Yuki N, Hattori T, Kohno Y. Electrophysiological subtypes and prognosis of childhood Guillain-Barre syndrome in Japan. *Muscle Nerve* 2006; 33: 766-70.

- Netto AB, Taly AB, Kulkarni GB, Rao UG, Rao S. Mortality in mechanically ventilated patients of Guillain Barre Syndrome. *Ann Indian Acad Neurol* 2011; 14: 262-6.
- Northington JW, Brown MJ. Acute canine idiopathic polyneuropathy. A Guillain-Barre-like syndrome in dogs. *J Neurol Sci* 1982; 56: 259-73.
- Nyati KK, Prasad KN, Kharwar NK, Soni P, Husain N, Agrawal V, Jain AK. Immunopathology and Th1/Th2 immune response of *Campylobacter jejuni*-induced paralysis resembling Guillain-Barre syndrome in chicken. *Med Microbiol Immunol* 2012; 201: 177-87.
- Nyland H, Matre R, Mork S. Immunological characterization of sural nerve biopsies from patients with Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 1981; 9 Suppl: 80-6.
- Panzer M, Sitte S, Wirth S, Drexler I, Sparwasser T, Voehringer D. Rapid In Vivo Conversion of Effector T Cells into Th2 Cells during Helminth Infection. *The Journal of Immunology* 2012; 188: 517-8.
- Porter B, Schatzberg S, McDonough S, Mertens D, de Lahunta A. Ganglioradiculitis (sensory neuronopathy) in a dog: clinical, morphologic, and immunohistochemical findings. *Vet Pathol* 2002; 39: 598-602.
- Potschka H, Fischer A, von Ruden EL, Hulsmeier V, Baumgartner W. Canine epilepsy as a translational model? *Epilepsia* 2013; 54: 571-9.
- Prelaud AR, Fuchs S, Weber K, Winter G, Coester C, Mueller RS. In vitro effects of CpG oligodeoxynucleotides delivered by gelatin nanoparticles on canine peripheral blood mononuclear cells of atopic and healthy dogs - a pilot study. *Vet Dermatol* 2013; 24: 494-e117.
- Prineas JW. Acute idiopathic polyneuritis. An electron microscope study. *Lab Invest* 1972; 26: 133-47.
- Prineas JW. Pathology of the Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 1981; 9 Suppl: 6-19.
- Putzu GA, Figarella-Branger D, Bouvier-Labit C, Liprandi A, Bianco N, Pellissier JF. Immunohistochemical localization of cytokines, C5b-9 and ICAM-1 in peripheral nerve of Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Sci* 2000; 174: 16-21.
- Rankin R, Pontarollo R, Ioannou X, Krieg AM, Hecker R, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2001; 11: 333-40.
- Rees JH, Soudain SE, Gregson NA, Hughes RA. *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barre syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333: 1374-9.
- Rees JH, Thompson RD, Smeeton NC, Hughes RA. Epidemiological study of Guillain-Barre syndrome in south east England. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64: 74-7.
- Rinaldi S, Brennan KM, Kalna G, Walgaard C, Jacobs BC, Yu RK, Willison HJ. Combinatorial glycoarray detects diverse new antibody specificities in

- Guillain-Barre syndrome. *J Peripher Nerv Syst* 2011; 16: 116-7.
- Rinaldi S, Brennan KM, Kalna G, Walgaard C, van Doorn P, Jacobs BC, Yu RK, Mansson JE, Goodyear CS, Willison HJ. Antibodies to heteromeric glycolipid complexes in Guillain-Barre syndrome. *PLoS One* 2013; 8: e82337.
- Rinaldi S. Update on Guillain-Barre syndrome. *J Peripher Nerv Syst* 2013; 18: 99-112.
- Rupp A, Galban-Horcajo F, Bianchi E, Dondi M, Penderis J, Cappell J, Burgess K, Matiassek K, McGonigal R, Willison HJ. Anti-GM2 ganglioside antibodies are a biomarker for acute canine polyradiculoneuritis. *J Peripher Nerv Syst* 2013; 18: 75-88.
- Saida T, Saida K, Dorfman SH, Silberberg DH, Sumner AJ, Manning MC, Lisak RP, Brown MJ. Experimental allergic neuritis induced by sensitization with galactocerebroside. *Science* 1979; 204: 1103-6.
- Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006; 212: 8-27.
- Sanders ME, Koski CL, Robbins D, Shin ML, Frank MM, Joiner KA. Activated terminal complement in cerebrospinal fluid in Guillain-Barre syndrome and multiple sclerosis. *J Immunol* 1986; 136: 4456-9.
- Sejvar JJ, Baughman AL, Wise M, Morgan OW. Population incidence of Guillain-Barre syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology* 2011a; 36: 123-33.
- Sejvar JJ, Kohl KS, Gidudu J, Amato A, Bakshi N, Baxter R, Burwen DR, Cornblath DR, Cleerbout J, Edwards KM, Heininger U, Hughes R, Khuri-Bulos N, Korinthenberg R, Law BJ, Munro U, Maltezou HC, Nell P, Oleske J, Sparks R, Velentgas P, Vermeer P, Wiznitzer M, Brighton Collaboration GBSWG. Guillain-Barre syndrome and Fisher syndrome: case definitions and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine* 2011b; 29: 599-612.
- Sekiguchi Y, Uncini A, Yuki N, Misawa S, Notturmo F, Nasu S, Kanai K, Noto Y, Fujimaki Y, Shibuya K, Ohmori S, Sato Y, Kuwabara S. Antiganglioside antibodies are associated with axonal Guillain-Barre syndrome: a Japanese-Italian collaborative study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 23-8.
- Shahrizaila N, Yuki N. Guillain-barre syndrome animal model: the first proof of molecular mimicry in human autoimmune disorder. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 829129.
- Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, Munteanu LS, Bröcker EB, Zillikens D. Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 664-71.
- Six A, Mariotti-Ferrandiz ME, Chaara W, Magadan S, Pham HP, Lefranc MP,

- Mora T, Thomas-Vaslin V, Walczak AM, Boudinot P. The Past, Present, and Future of Immune Repertoire Biology - The Rise of Next-Generation Repertoire Analysis. *Front Immunol* 2013; 4: 413.
- Soliven B. Autoimmune neuropathies: insights from animal models. *J Peripher Nerv Syst* 2012; 17 Suppl 2: 28-33.
- Sommer C, Brandner S, Dyck PJ, Magy L, Mellgren SI, Morbin M, Schenone A, Tan E, Weis J, Enmc. 147th ENMC international workshop: guideline on processing and evaluation of sural nerve biopsies, 15-17 December 2006, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2008; 18: 90-6.
- Sommer CL, Brandner S, Dyck PJ, Harati Y, LaCroix C, Lammens M, Magy L, Mellgren SI, Morbin M, Navarro C, Powell HC, Schenone AE, Tan E, Urtizberea A, Weis J, Society PN. Peripheral Nerve Society Guideline on processing and evaluation of nerve biopsies. *J Peripher Nerv Syst* 2010; 15: 164-75.
- Souayah N, Nasar A, Suri MF, Qureshi AI. Guillain-Barre syndrome after vaccination in United States a report from the CDC/FDA Vaccine Adverse Event Reporting System. *Vaccine* 2007; 25: 5253-5.
- Spies JM, Pollard JD, Bonner JG, Westland KW, McLeod JG. Synergy between antibody and P2-reactive T cells in experimental allergic neuritis. *J Neuroimmunol* 1995; 57: 77-84.
- Stanciu GD, Musteata M, Armasu M, Saftencu PM, Solcan G. Electrophysiological Aspects in Idiopathic Acute Canine Polyradiculoneuritis. *Bulletin UASVM Veterinary Medicine* 2014; 71: 292-7.
- Stanciu GD, Solcan G. Acute idiopathic polyradiculoneuritis concurrent with acquired myasthenia gravis in a West Highland white terrier dog. *BMC Vet Res* 2016; 12: 111.
- Susuki K, Nishimoto Y, Koga M, Nagashima T, Mori I, Hirata K, Yuki N. Various immunization protocols for an acute motor axonal neuropathy rabbit model compared. *Neurosci Lett* 2004; 368: 63-7.
- Susuki K, Rasband MN, Tohyama K, Koibuchi K, Okamoto S, Funakoshi K, Hirata K, Baba H, Yuki N. Anti-GM1 antibodies cause complement-mediated disruption of sodium channel clusters in peripheral motor nerve fibers. *J Neurosci* 2007; 27: 3956-67.
- Susuki K, Yuki N, Schafer DP, Hirata K, Zhang G, Funakoshi K, Rasband MN. Dysfunction of nodes of Ranvier: a mechanism for anti-ganglioside antibody-mediated neuropathies. *Exp Neurol* 2012; 233: 534-42.
- Tekgul H, Serdaroglu G, Tutuncuoglu S. Outcome of axonal and demyelinating forms of Guillain-Barré syndrome in children. *Pediatric Neurology* 2003; 28: 295-9.
- Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods* 2008; 329: 112-24.



- Umapathi T, Tan EY, Kokubun N, Verma K, Yuki N. Non-demyelinating, reversible conduction failure in Fisher syndrome and related disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 941-8.
- Uncini A. A common mechanism and a new categorization for anti-ganglioside antibody-mediated neuropathies. *Exp Neurol* 2012; 235: 513-6.
- Uncini A, Kuwabara S. Electrodiagnostic criteria for Guillain-Barre syndrome: a critical revision and the need for an update. *Clin Neurophysiol* 2012; 123: 1487-95.
- Uncini A, Susuki K, Yuki N. Nodoparaneuropathy: beyond the demyelinating and axonal classification in anti-ganglioside antibody-mediated neuropathies. *Clin Neurophysiol* 2013; 124: 1928-34.
- van den Berg B, Bunschoten C, van Doorn PA, Jacobs BC. Mortality in Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 2013; 80: 1650-4.
- van der Meché FG, van Doorn PA. Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: immune mechanisms and update on current therapies. *Ann Neurol* 1995; 37 Suppl 1: S14-31.
- van Doorn PA. Diagnosis, treatment and prognosis of Guillain-Barre syndrome (GBS). *Presse Med* 2013; 42: e193-201.
- Visser LH, Schmitz PI, Meulstee J, van Doorn PA, van der Meche FG. Prognostic factors of Guillain-Barre syndrome after intravenous immunoglobulin or plasma exchange. Dutch Guillain-Barre Study Group. *Neurology* 1999; 53: 598-604.
- Volk HA, Shihab N, Matiasek K. Neuromuscular disorders in the cat: clinical approach to weakness. *J Feline Med Surg* 2011; 13: 837-49.
- Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, Wader T, Tluk S, Liu M, Davis HL, Krieg AM. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 2004; 34: 251-62.
- Wang X, Ma C, Wu J, Zhu J. Roles of T helper 17 cells and interleukin-17 in neuroautoimmune diseases with emphasis on multiple sclerosis and Guillain-Barre syndrome as well as their animal models. *J Neurosci Res* 2013; 91: 871-81.
- Wang Y, Sun S, Zhu J, Cui L, Zhang HL. Biomarkers of Guillain-Barre Syndrome: Some Recent Progress, More Still to Be Explored. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 564098.
- Weerth S, Berger T, Lassmann H, Linington C. Encephalitogenic and neuritogenic T cell responses to the myelin-associated glycoprotein (MAG) in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 1999; 95: 157-64.
- Willison HJ, Yuki N. Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 2002; 125: 2591-625.
- Willison HJ. The translation of the pathological findings described in humans to experimental models of acute motor axonal neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2012; 17 Suppl 3: 3-8.

- Willison HJ, Jacobs BC, van Doorn PA. Guillain-Barre syndrome. *Lancet* 2016; 388: 717-27.
- Winer JB. Guillain Barre syndrome. *Mol Pathol* 2001; 54: 381-5.
- Wu X, Wang J, Liu K, Zhu J, Zhang HL. Are Th17 cells and their cytokines a therapeutic target in Guillain-Barre syndrome? *Expert Opin Ther Targets* 2016; 20: 209-22.
- Xia RH, Yosef N, Ubogu EE. Clinical, electrophysiological and pathologic correlations in a severe murine experimental autoimmune neuritis model of Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol* 2010; 219: 54-63.
- Yang M, Peyret C, Shi XQ, Siron N, Jang JH, Wu S, Fournier S, Zhang J. Evidence from Human and Animal Studies: Pathological Roles of CD8(+) T Cells in Autoimmune Peripheral Neuropathies. *Front Immunol* 2015; 6: 532.
- Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 2008; 28: 29-39.
- Ye Y, Wang K, Deng F, Xing Y. Electrophysiological subtypes and prognosis of Guillain-Barre syndrome in northeastern China. *Muscle Nerve* 2013; 47: 68-71.
- Yuki N, Taki T, Inagaki F, Kasama T, Takahashi M, Saito K, Handa S, Miyatake T. A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J Exp Med* 1993; 178: 1771-5.
- Yuki N, Kuwabara S, Koga M, Hirata K. Acute motor axonal neuropathy and acute motor-sensory axonal neuropathy share a common immunological profile. *J Neurol Sci* 1999; 168: 121-6.
- Yuki N, Yamada M, Koga M, Odaka M, Susuki K, Tagawa Y, Ueda S, Kasama T, Ohnishi A, Hayashi S, Takahashi H, Kamijo M, Hirata K. Animal model of axonal Guillain-Barre syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Ann Neurol* 2001; 49: 712-20.
- Yuki N. Ganglioside mimicry and peripheral nerve disease. *Muscle Nerve* 2007; 35: 691-711.
- Yuki N, Hartung HP. Guillain-Barre syndrome. *N Engl J Med* 2012; 366: 2294-304.
- Zhang H, Wu LM, Wu J. Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines. *Mediators Inflamm* 2011; 2011: 949072.
- Zhang HL, Wu J, Zhu J. The role of apolipoprotein E in Guillain-Barre syndrome and experimental autoimmune neuritis. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 357412.
- Zhang HL, Azimullah S, Zheng XY, Wang XK, Amir N, Mensah-Brown EP, Al Shamsi M, Shahin A, Press R, Zhu J, Adem A. IFN-gamma deficiency exacerbates experimental autoimmune neuritis in mice despite a mitigated systemic Th1 immune response. *J Neuroimmunol* 2012; 246:

18-26.

Zhang HL, Zheng XY, Zhu J. Th1/Th2/Th17/Treg cytokines in Guillain-Barre syndrome and experimental autoimmune neuritis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013; 24: 443-53.

Zhang Z, Zhang ZY, Fauser U, Schluesener HJ. Valproic acid attenuates inflammation in experimental autoimmune neuritis. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 4055-65.

Zhu J, Bai XF, Mix E, Link H. Cytokine dichotomy in peripheral nervous system influences the outcome of experimental allergic neuritis: dynamics of mRNA expression for IL-1 beta, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-alpha, TNF-beta, and cytolysin. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84: 85-94.

Zhu J, Mix E, Link H. Cytokine production and the pathogenesis of experimental autoimmune neuritis and Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol* 1998; 84: 40-52.

## **IX ANHANG**

### **1 Methodische Ergänzungen**

#### **1.1 Vorbereitung der Nervenfasern**

Die vorliegende Nervenfaser wird von dem umliegenden Gewebe befreit und es erfolgt eine Vorpräparation mit Aufteilung des Nervenfaserbündels in kleinere Bündel von ca. 1 mm Durchmesser.

Für die Routinediagnostik werden die Nervenfasern in 2,5 % Glutaraldehyd für 2 h fixiert, in Vorbereitung für die Osmiumtetroxid- und Hämatoxylin-Färbung.

Für die WMI wird im Hinblick auf einen optimalen Antigenerhalt eine Fixierung in 4 % Paraformaldehyd oder 10 % Formalin vorgenommen.

##### **1.1.1 Osmiumtetroxid-Färbung der NFZ**

Nach einem Spüldurchgang in Sörensen-Phosphatpuffer werden die Nervenfasern für 2 h in 2 % Osmiumtetroxid bei RT im Dunkeln postfixiert. Anschließend erfolgt ein weiterer Waschschrift in Sörensen-Phosphatpuffer und die Überführung in 100 % Glycerin.

##### **1.1.2 Hämatoxylin-Färbung der NFZ**

Vor der Kernfärbung werden die Nervenfasern mit Sörensen-PBS-Waschlösung gespült. Die Kerne der Schwannzellen und Entzündungszellen werden durch die Färbung mit Hämatoxylin (maximal 2 min) sichtbar gemacht. Im Anschluss an die Färbung folgt ein Spüldurchgang von 5 min und die Überführung in 100 % Glycerin.

#### **1.2 Herstellung von NFZ**

Die Auftrennung der fixierten und gefärbten Nervenfaserbündel erfolgt in 100 % Glycerin mit Hilfe eines Stereomikroskops und zweier Pinzetten. Das Nervenfaserbündel wird hierfür an einem Ende mit den zwei Pinzetten, jeweils von rechts und links, gefasst und der Länge nach separiert. Im Anschluss werden die einzelnen Nervenfasern der Reihe nach auf einen Objektträger aufgezogen.

Auf die mit Osmiumtetroxid oder Hämatoxylin gefärbten Nervenfasern wird 100 % Glycerin tropfenweise aufgetragen und ein Deckglas aufgebracht, welches mit Hilfe eines Xylol-basierten Eindeckelmediums befestigt wird.

Die Nervenfasern, die für die WMI bestimmt sind, werden mit AGT<sup>TM</sup> Flexibler Sekundenkleber oder Araldite® 2020 befestigt und bei -20 °C bis zur Durchführung der WMI gelagert.

### 1.3 WMI-Protokoll

Tabelle 7. WMI-Protokoll.

Schritt	Vorgang	Zeit & Wiederholungen	Temperatur /Bedingung	Reagenzien
1)	Rehydrierung	1 h	RT	0,01 M pH 7,0-7,6 PBS
2)	Spülen	5 min jeweils, dreimal	RT	0,01 M pH 7,0-7,6 PBS
3)	Postfixative Behandlung	15 min	37° C, Feuchtkammer	Proteinase-K
	oder			
	Hitzebasierte Antigendemaskierung	Bis Puffer kocht	800 Watt	Zitronensäure-PBS-Lösung (10 mMol, pH 5,4)
		20 min	250 Watt	
4)	Spülen	15 min	RT	
		5 min jeweils, dreimal	RT	0,01 M pH 7,0-7,6 PBS
5)	Blockieren der endogenen Peroxidase	30 min	RT	0,3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,01 M pH 7,0-7,6 PBS
6)	Spülen	5 min jeweils, dreimal	RT	0,01 M pH 7,0-7,6 PBS

7)	<b>Blockieren einer nicht-spezifischen Bindung</b>	30 min	RT, Feuchtkammer	2,5 % gewöhnliches Pferde-Serum, ImmPRESS™
8)	<b>Inkubation mit dem Primär-Antikörper</b>	4 Tage	RT, Feuchtkammer	1:1000, NF200 verdünnt in 1% Triton™ X-0,01 M pH 7,3 PBS
		5 Tage	37° C, Feuchtkammer	
9)	<b>Spülen</b>	5 min jeweils, dreimal	RT	0,01 M pH 7,0- 7,6 PBS
10)	<b>Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper</b>	30 min	RT, Feuchtkammer	Polymer Anti- Maus IgG, ImmPRESS™
11)	<b>Spülen</b>	5 min jeweils, dreimal	RT	0,01 M pH 7,0- 7,6 PBS
12)	<b>Immunhistochemische Färbung</b>	< 1 min, bis zur makroskopischen Anfärbung	RT	DAB
13)	<b>Stoppen der Färbereaktion und Entfernen der Präzipitate</b>	5 min	RT	Aqua bidest.
14)	<b>Spülen</b>	5 min jeweils, dreimal	RT	0,01 M pH 7,0- 7,6 PBS
15)	<b>Auftropfen von Glycerin</b>	<10 s	RT	100 % Glycerin
16)	<b>Eindeckeln und Versiegeln</b>	<5 min	RT	Histokitt®

## 2 Materialien

### 2.1 Verwendete Chemikalien

AGT <sup>TM</sup> Flexibler Sekundenkleber	Pearl.GmbH, Buggingen, Deutschland, im Auftrag von der Firma AGT
Araldite® 2020	Huntsman, Salt Lake City, Vereinigte Staaten
Coltogum® Montagekleber Super	Coltogum, Rheineck, Schweiz
DAB Tablets 10 mg fizzing buffer pH 7.0	Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dänemark
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
D(+) Saccharose	Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe Deutschland
Glycerin wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd 25 %	Serva, Heidelberg, Deutschland
Histokitt® Eindeckmedium	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim/Röhn, Deutschland
ImmPRESS™ HRP Anti-Rabbit IgG (Peroxidase) Polymer Detection Kit, made in Horse	Vector Laboratories Inc., Burlingame, Vereinigte Staaten
ImmPRESS™ HRP Anti-Mouse IgG (Peroxidase) Polymer Detection Kit, made in Horse	Vector Laboratories Inc., Burlingame, Vereinigte Staaten
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat, wasserfrei zur Analyse	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mayer's Hämalun	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid zur Analyse	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Neurofilament-200 (NF200), Maus, monoklonal, Klon NE14	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Osmiumtetroxid 99,9 %	ChemPur, Karlsruhe, Deutschland



---

Paraformaldehyd 4 % in Phosphat Puffer	Affymetrix, Ohio, Vereinigte Staaten
Proteinase K	DAKO Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, Vereinigte Staaten
Triethylamin-HCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Tri-Natriumzitat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Triton <sup>TM</sup> -X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
UHU® Glas Spezialkleber	UHU, Bühl, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 % zur Analyse	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure Monohydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

## 2.2 Verwendete Lösungen

- 0,1 M Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (pH 7,3)  
Di-Natriumhydrogenphosphat 1,48 g  
Kaliumhydrogenphosphat 0,43 g  
Natriumchlorid 7,2 g  
ad 1 l Aqua dest.

mit Natronlauge (NaOH) und Salzsäure (HCl) auf den entsprechenden pH-Wert titrieren.

- 0,01 M PBS (pH 7,3)  
Di-Natriumhydrogenphosphat 0,15 g  
Kaliumhydrogenphosphat 0,04 g  
Natriumchlorid 0,72 g  
ad 1 l Aqua dest.

mit NaOH und HCl auf den entsprechenden pH-Wert titrieren.

- 0,1 M PBS (pH 7,3)  
7,4 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat  
36,0 g Natriumchlorid  
2,15 g Kaliumhydrogenphosphat  
ad 5,0 l Aqua dest.

mit NaOH und HCl auf den entsprechenden pH-Wert titrieren.

- 1 %ige Triton X-PBS-Lösung  
1ml Triton-X-100  
ad 100 ml 0,01 M PBS (pH 7,3)

- 30 % Saccharose-PBS-Lösung  
30 g D(+) Saccharose  
ad 100 ml 0,1 M PBS (pH 7,3)

- 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)-Lösung  
1 Tablette DAB  
ad 10,0 ml Aqua dest.

In je 1ml Portionen abfüllen und tiefgefroren bei -18 °C aufbewahren.

Vor Gebrauch bei Raumtemperatur im Dunklen auftauen und pro 1 ml DAB-Lösung 1,0 µl 30 %iges Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zugeben.

- 2,5 % Glutaraldehyd  
10 ml Glutaraldehyd 25 %  
ad 100 ml 0,067 M Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7,4)
- 0,067 M Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7,4)

#### Lösung A

Kaliumdihydrogenphosphat 9,078 g  
ad 1000 ml Aqua dest.

#### Lösung B

Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 11,876 g  
ad 1000 ml Aqua dest.

Um einen pH-Wert von 7,4 zu erreichen werden 80,8 ml der Lösung B mit 100 ml der Lösung A aufgefüllt.

- 10 mM Zitronensäure-PBS-Lösung (pH-Wert 5,4)

#### Lösung A

Zitronensäure 21,01 g  
ad 1000 ml Aqua dest.

#### Lösung B

Tri-Natriumzitat-Dihydrat 29,41 g  
ad 1000 ml Aqua dest.

Gebrauchslösung: 9 ml Lösung A + 41 ml Lösung B + 450 ml Aqua dest.

- 2 % Osmiumtetroxid  
1,0 g Ampulle Osmiumtetroxid  
ad 50 ml Aqua dest.

Es dauert 1-2 Tage, bis sich die Osmiumkristalle gelöst haben.

- Glycinpuffer (pH 6,0)  
Triethylamin-HCl 3,4415 g  
Glycin 26,2745 g

ad 1000 ml Aqua dest.

## 2.3 Verwendete Geräte

Mikroskop Zeiss Axiophot 2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
Mikroskopkamera Leica DFC 295	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland
Objektträger Star Frost adhesive	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Edermünde, Deutschland
Stereomikroskop Zeiss Stemi DV4	Zeiss Oberkochen, Deutschland

## 2.4 Verwendete Software

Text, Grafiken und Tabellen	Microsoft Office 2016
Statistik	GraphPad PRISM (GraphPad Software INC.)
Literaturverwaltung	EndNote X7 (EndNote™ Software)

## **X        DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Kaspar Matiassek, für die Überlassung des Themas und für den wertschätzenden und kollegialen Umgang. Danke für die Unterstützung, für das Interesse an meinen Fortschritten aber auch für die Anteilnahme an Misserfolgen, für die motivierende Arbeitsatmosphäre sowie die Möglichkeit, mich selber zu entfalten und für die vielen bereichernden Gespräche.

Als nächstes möchte ich meinen großen Dank der Jürgen Manchot Stiftung aussprechen, ohne die es mir nicht möglich gewesen wäre, in diesem Umfang an meiner Doktorarbeit zu arbeiten. Vielen Dank dafür, dass Sie es mir ermöglicht haben, dieses mir so ans Herz gewachsene Projekt durchzuführen.

Dr. Marco Rosati möchte ich für die Einarbeitung und Unterstützung in allen labortechnischen Fragen danken. Danke, dass Du mir immer mit Rat und Tat und deiner guten Laune zur Seite standest, wenn die Nervenfasern mal wieder nicht so wollten wie ich.

Eine weitere wichtige Anlaufstelle, vor allem wenn es um immunhistochemische Fragen ging, war Frau Karin Stingl. Liebe Karin, vielen Dank für die vielen Stunden, in denen du so regen Anteil an meinen immunhistochemischen Problemen genommen und immer einen guten Rat für mich gehabt hast!

Auch Heidrun Schöl möchte ich danken, die mich in die Aufarbeitung von Nervenbiopsien eingeführt hat. Liebe Heidrun, vielen Dank, dass Du Dir immer die Zeit für mich genommen und mich mit zusätzlichem Infomaterial versorgt hast!

Danke auch an Claudia Mair und Sabine Arnold für die nette und motivierende Arbeitsatmosphäre.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Andrea Fischer für die Beleuchtung der klinischen Aspekte dieser Studie.

An meine lieben Mitdoktoranden ein herzliches Dankeschön: Eva, Judith, Simon, Ulli, Carina, Maya und Clara. Wir waren ein super Team, haben uns gegenseitig immer unterstützt und viel zusammen gelacht. Mein besonderer

Dank gilt Dir, liebe Soni, danke, dass du immer für mich da bist und wir uns gegenseitig immer wieder motivieren konnten, ich bin froh, dass wir uns durch die Doktorarbeit gefunden haben!

Liebe Patsi, liebe Julia, ihr habt mich auf meinem tiermedizinischen Weg von Anfang an begleitet, wir haben alle Höhen und Tiefen zusammen durchgestanden, danke für eure Freundschaft und die unvergessliche Zeit, die wir zusammen hatten!

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner ganzen Familie, danke, dass ihr immer für mich da seid und mich in allem unterstützt! Bei meinem Bruder Jo und meinen Großeltern möchte ich mich von Herzen für eure Liebe und den festen Rückhalt bedanken. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglicht haben, liebe Mama, lieber Papa, vielen Dank für eure liebevolle Unterstützung, euren Glauben in mich und eure positive Energie!

Meinem Freund Daniel möchte ich für seine bedingungslose Liebe und Unterstützung in allen Lebenslagen danken. Danke, dass du immer für mich da bist, bei scheinbar ausweglosen Problemen eine Antwort hast, mich wenn nötig wieder aufgemuntert und motiviert hast und immer hinter mir stehst!